

Université de Montréal

**Évaluation de l'effet antidiabétique de plantes médicinales  
de la forêt boréale et identification des principes actifs de  
deux espèces prometteuses**

Par

Abir El Hamaoui El Nachar

Département de pharmacologie

Faculté de médecine

Thèse présentée à la Faculté de médecine  
en vue de l'obtention du grade de doctorat

En pharmacologie

Option moléculaire

Mars 2014

©Abir Nachar, 2014

Université de Montréal

Faculté de médecine

Cette thèse intitulée:

Évaluation de l'effet antidiabétique de plantes médicinales de la forêt  
boréale et identification des principes actifs de deux espèces  
prometteuses

Présentée par: Abir El Hamaoui El Nachar

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes :

Dr Martin G. Sirois, président-rapporteur

Dr Pierre S. Haddad, directeur de recherche

Dr Ashok K. Srivastava, membre interne

Dr André Tchernof, examinateur externe

Dre Josette Noël, représentante du doyen

## Résumé

Le diabète de type 2 est une maladie chronique dont l'incidence est en augmentation continuelle. Le risque de développer le diabète de type 2 chez les populations autochtones du Canada est de trois à cinq fois plus élevé que le reste de la population canadienne. La forêt boréale comporte plusieurs plantes médicinales ayant un potentiel pour le traitement ou la prévention du diabète. Certaines de ces plantes font partie de la médecine traditionnelle et alternative Crie. Des enquêtes ethnobotaniques ont amené notre équipe de recherche à identifier 17 extraits de plantes médicinales utilisées par les Cris d'Eeyou Istchee (Baie James, Québec) pour traiter les symptômes du diabète. Parmi ces extraits, certains ont montré des activités anti-diabétiques au niveau des cellules musculaires, des adipocytes et dans des études in vivo réalisées chez des animaux. Le but de cette thèse est d'élucider l'effet de ces 17 plantes sur l'homéostasie hépatique de glucose, d'identifier l'espèce la plus prometteuse et isoler ces constituants actifs. De même, le bleuet nain du genre *Vaccinium angustifolium* fait partie de la forêt boréale canadienne et est connu pour ses activités anti-diabétiques. Une biotransformation du jus de bleuet lui confère une activité antioxydante accrue et un profil biologique différent. Le deuxième but de cette thèse est d'élucider les mécanismes d'action par lesquels le jus de bleuet biotransformé (BJ) exerce son effet anti-diabétique et d'identifier ses principes actifs.

Les résultats ont montré que trois extraits de plantes Cris se sont démarqués par leur effet sur l'homéostasie hépatique de glucose. *Picea glauca* exerce son effet en diminuant la production de glucose alors que *Larix laricina* agit en augmentant le stockage de glucose. *Abies balsamea* a montré le profil le plus prometteur, elle agit simultanément en diminuant l'activité de la Glucose-6-phosphatase (G6Pase) via la stimulation des voies insulino-dépendante et -indépendante et en augmentant l'activité de la Glycogène synthétase (GS) suite à la phosphorylation de la Glycogène synthase kinase-3. Le fractionnement de l'extrait d'*Abies balsamea* guidé par les deux bioessais a mené à l'isolation de trois composés actifs; l'acide abiétique (AA), l'acide déhydroabiétique (DAA) et le squalène (SQ). Les principes actifs ont montré le même mécanisme d'action que l'extrait brut en diminuant l'activité de la G6Pase et augmentant celle de la GS ainsi qu'en activant les voies de signalisation impliquées. Le DAA

s'est démarqué par son effet le plus puissant et très comparable à celui de l'extrait d'*Abies balsamea* dans toutes les expériences.

De son côté le BJ a montré un effet sur la diminution de la production hépatique de glucose, l'augmentation de son stockage ainsi que l'augmentation de son transport dans le muscle. Son fractionnement guidé par les bioessais a permis d'isoler sept fractions dont trois étaient les plus actives. L'identification des constituants de ces fractions actives a mené à isoler quatre composés phénoliques; *l'acide chlorogénique*, *l'acide gallique*, *l'acide protocatéchique* et le *catéchol*. Le catéchol s'est démarqué avec ses effets les plus puissants en diminuant l'activité de la G6Pase, augmentant celle de la GS et en stimulant le transport de glucose dans le muscle.

Les résultats de cette thèse indiquent que la diminution de la production hépatique de glucose peut s'ajouter au profil anti-diabétique de certaines plantes médicinales Cries et surtout à celui d'*A.balsamea* dont les composés actifs peuvent aider dans le développement de nouvelles molécules anti-diabétiques. De plus, les résultats de cette thèse ont montré que l'activité anti-diabétique du BJ implique le contrôle de l'homéostasie de glucose au niveau du foie et du muscle. L'identification du catéchol comme principe actif avec potentiel anti-diabétique prometteur pourra servir pour des fins thérapeutiques ultérieures.

**Mots-clés** : Diabète de type 2, *Abies balsamea*, G6Pase, GS, GSK-3, Akt, AMPK, jus de bleuet biotransformé, produits de santé naturels, la forêt boréale canadienne, les populations autochtones du Nord du Canada.

## Abstract

Type 2 diabetes is a chronic disease for which incidence is continuously increasing. The risk of developing type 2 diabetes among Aboriginal people in Canada is three to five times higher than the rest of the Canadian population. The boreal forest has several medicinal plants with potential for the treatment or prevention of diabetes. Some of these plants are part of the Cree traditional and alternative medicine. Ethnobotanical surveys led our research team to identify 17 medicinal plant extracts used by the Crees of Eeyou Istchee (James Bay, Quebec) to treat symptoms of diabetes. Some extracts showed anti-diabetic activities in muscle cells, adipocytes and *in vivo* studies in animals. The aim of this thesis is to elucidate the effect of these 17 plants on hepatic glucose homeostasis, to identify the most promising species and isolate its active constituents. Similarly, Canadian lowbush blueberry, *Vaccinium angustifolium*. Ait, is part of the Canadian boreal forest and is known for its anti-diabetic activities. Biotransformation of blueberry juice gives it an increased antioxidant activity and a different biological profile. The second aim of this thesis is to elucidate the mechanisms of action by which biotransformed blueberry juice (BJ) exerts its anti-diabetic effect and identify its active constituents.

The results showed that three Cree plants stood out with their effect on hepatic glucose homeostasis. *Picea glauca* exerts its effect by reducing glucose production whereas *Larix laricina* works by increasing its the storage. *Abies balsamea* showed the most promising profile, simultaneously and powerfully reducing glucose-6-phosphatase (G6Pase) involving both insulin-dependent and -independent pathways and stimulating Glycogen synthase (GS) via phosphorylation of Glycogen synthase kinase-3 (GSK-3). Bioassay-guided fractionation of *Abies balsamea* led to the isolation of three active compounds; *Abietic acid* (AA), *dehydroabietic acid* (DAA) and *squalene* (SQ). The active constituents have shown the same mechanism of action as the crude extract by decreasing the activity of G6Pase, increasing that of the GS and activating signaling pathways. DAA stood out for its most powerful effect close to that of the crude extract in all experiments.

Our results showed that anti-diabetic activity of BJ involves decrease in hepatic glucose production, increase of storage and enhancement of glucose uptake in muscle. Its bioassay-

guided fractionation led to isolate seven fractions, three of which were the most active. Identification of components in the active fractions resulted in four isolated phenolic compounds; *chlorogenic acid*, *gallic acid*, *protocatechuic acid* and *catechol*. *Catechol* stood out with its most powerful effects by decreasing the activity of G6Pase, increasing the GS and stimulating glucose transport in muscle.

Our results thus confirm that the reduction of hepatic glucose production likely contributes to the therapeutic potential of several anti-diabetic Cree traditional plant and especially that of *Abies balsamea* whose active compounds may help in the development of new anti-diabetic molecules. In addition, the results of this thesis showed that the anti-diabetic activity of BJ involves control of glucose homeostasis in the liver and muscle. Identification of *catechol* as an active compound with anti-diabetic promising potential can be used for future therapeutic purposes.

**Keywords:** Type 2 diabetes, *Abies balsamea*, G6Pase, GS, GSK-3, Akt, AMPK, biotransformed blueberry juice, natural health products, Canadian boreal forest, Aboriginal population of Northern Canada.

## **Table des matières**

Résumé.....	i
Abstract.....	iii
Table des matières.....	v
Liste des tableaux.....	viii
Liste des figures .....	ix
Liste des abréviations.....	xi
Remerciements.....	xiv
Chapitre 1 : Introduction.....	16
1.1. Homéostasie de l'énergie.....	17
1.1.2. Homéostasie de glucose.....	17
1.1.2.2. La voie de signalisation de la PI3-Kinase.....	18
1.1.2.3. La voie de signalisation de Ras-MAPK.....	19
1.1.2.4. La voie de signalisation CAP/Cbl/TC10.....	19
1.1.2.5. Production hépatique de glucose : Néoglucogenèse.....	20
1.1.2.6. Glycolyse .....	23
1.1.2.7. Stockage de glucose sous forme de glycogène dans le foie et le muscle : Glycogénogenèse .....	23
1.1.2.8. Glycogénolyse.....	23
1.1.3. Transport de glucose.....	24
1.1.3.1. Variétés des transporteurs de glucose.....	24
1.1.3.2. Régulation du transport de glucose par la voie de signalisation de l'insuline .	25
1.1.3.3. Autre voie de régulation : voie de l'AMPK.....	26
1.1.4. Métabolisme des lipides et régulation.....	27
1.2. Diabète .....	28
1.2.1 Définition et prévalence .....	28
1.2.2. Types et classification.....	28
1.2.2.1 Diabète de type 1 .....	28
1.2.2.2. Diabète de type 2 .....	29

1.2.2.3. Diabète gestationnel.....	29
1.2.3. Physiopathologie du diabète de type 2.....	29
1.2.3.1. Résistance à l'insuline.....	30
1.2.3.1.1. Obésité et lipotoxicité .....	30
1.2.3.1.2. Tissu adipeux et sécrétion endocrinienne .....	32
1.2.3.1.2.1. Leptine .....	32
1.2.3.1.2.2. Adiponectine .....	32
1.2.3.1.2.3. Résistine.....	33
1.2.3.1.3. Inflammation et résistance à l'insuline .....	34
1.2.4. Complications du diabète.....	35
1.2.5. Traitements du diabète de type 2 .....	36
1.2.5.1. Alimentation et style de vie .....	36
1.2.5.2. Traitement pharmacologique : variété et classes des médicaments hypoglycémiants .....	36
1.2.5.2.1. Les insulinosécrétagogues .....	37
1.2.5.2.1.1. Les sulphonylurés .....	37
1.2.5.2.1.2. Les glitinides .....	38
1.2.5.2.2. Les insulino-sensibilisateurs .....	39
1.2.5.2.2.1. Les biguanides .....	39
1.2.5.2.2.2. Les thiazolidinediones (TZDs) .....	41
1.2.5.2.3. Les inhibiteurs de l' $\alpha$ -glucosidase .....	43
1.2.5.2.4. Les incrétines et les inhibiteurs de dipeptidyl peptidase-4 (DPP-4) .....	43
1.2.5.2.5. Les inhibiteurs de SGLT2.....	44
1.2.5.2.6. L'insuline .....	45
1.2.5.3. La médecine alternative et les produits de santé naturels .....	45
1.3. La pharmacopée traditionnelle Cri de la Baie James.....	46
1.4. Le bleuet nain du genre <i>Vaccinium</i> .....	47
1.4.1. Composition phytochimique du bleuet .....	49
1.4.1.1 Les flavonoïdes .....	49
1.4.1.1.1. Les anthocyanines.....	49
1.4.1.1.2. Les flavonols et les flavanols.....	50



1.4.1.2. Les tannins .....	50
1.4.1.2.1. Les tannins hydrolysables .....	50
1.4.1.2.2. Les tannins condensés (Pro-anthocyanidines) .....	50
1.4.1.3. Les acides phénoliques .....	51
1.4.1.4. Les stilbénoides.....	51
1.5. Hypothèses et objectifs de l'étude .....	51
Chapitre 2. Article 1 .....	54
The action of antidiabetic plants of the Canadian James Bay Cree traditional pharmacopeia on key enzymes of hepatic glucose homeostasis .....	54
Chapitre 3. Article 2.....	84
Regulation of hepatic glucose homeostasis by dehydroabietic acid, abietic acid and squalene isolated from balsam fir ( <i>Abies balsamea</i> (L.) Mill.) a plant of the Eastern James Bay Cree traditional pharmacopeia.....	84
Chapitre 4. Article 3.....	117
Phenolic compounds isolated from fermented blueberry juice decrease hepatic glucose output and enhance glucose uptake.....	117
Chapitre 5. Discussion générale et perspectives .....	148
Bibliographie.....	i

## **Liste des tableaux**

Tableau 1 : Distribution des différents transporteurs de glucose (GLUT) (tiré de (Rao, Shashidhar et al. 2013)). .....	25
--	----

### **Article 1**

Table 1: Optimal concentrations of plant extracts used to treat H4IIE and HepG2 cells were determined by the LDH cytotoxicity. ....	71
---	----

### **Article 2**

Table 1: Maximal non-toxic concentrations .....	104
Table 2: Compound identification. ....	105

### **Article 3**

Table 1: Concentration of samples used in G6Pase, GS and glucose uptake assays in H4IIE, HepG2 and C2C12 cells.....	137
---	-----

## Liste des figures

Figure 1 : Les voies de signalisation de l'insuline.....	18
Figure 2 : Les différentes réactions enzymatiques et points de contrôle de la voie de la néoglucogenèse.....	22
Figure 3 : Localisation de la G6Pase dans la cellule hépatique et schématisation de la dernière étape de la néoglucogenèse.....	22
Figure 4 : Activation de la translocation des GLUT4 vers la membrane cytoplasmique et augmentation du transport de glucose dans les cellules musculaires suite à la stimulation par la voie de signalisation de l'insuline.....	26
Figure 5 : Obésité, lipotoxicité et résistance à l'insuline. ....	31
Figure 6: Le cross talk entre les différents organes et l'apparition de la résistance à l'insuline. ....	35
Figure 7: Les principales classes pharmacologiques utilisées pour le traitement du diabète et leurs tissus cibles.....	37
Figure 8 : Mode d'action des insulinosécrétagogues.....	39
Figure 9: Mécanisme d'action de la metformine.....	41
Figure 10: Mécanisme d'action des thiazolidinediones.....	42
Figure 11: GLP-1 et ses effets sur le métabolisme.....	44
Figure 12 : Bleuet nain sauvage (lowbush blueberry), <i>Vaccinium angustifolium</i> . Ait.....	49
<b>Article 1</b>	
Figure 1: Effect of 17 plant extracts on the activity of G6Pase.....	72
Figure 2: Effect of insulin and two plant extracts on G6Pase activity.....	73
Figure 3A: Effect of 17 plant extracts on kinases regulating G6Pase activity. A) Phosphorylation of Akt.....	74
Figure 3B: Effect of 17 plant extracts on kinases regulating G6Pase activity. B) Phosphorylation of AMPK.....	75
Figure 4A: Effect of 17 plant extracts on components involved in hepatic glucose storage. A) Activation of GS.....	76
Figure 4B: Effect of 17 plant extracts on components involved in hepatic glucose storage. B) Phosphorylation of GSK-3.....	77

## Article 2

Figure 1: Effect of <i>A. balsamea</i> and its solvent fractions on G6Pase (A) and GS (B) activity.	108
Figure 2: Effect of the eight peaks isolated from the hexane fraction on the activity of G6Pase (A) and GS (B).	109
Figure 3: Effect of AA, DAA and SQ, isolated from the active peaks, on the activity of G6Pase (A) and GS (B).	110
Figure 4: Effect of AA, DAA and SQ, isolated from the active peaks, on kinases regulating G6Pase activity	111
Figure 5: Effect of AA, DAA and SQ, isolated from the active peaks, on GSK-3.	113

## Article 3

Figure 1: Effect of FJ and its seven fractions on G6Pase (A) and GS (B) activity.	138
Figure 2: Effect of FJ and its seven fractions on <sup>3</sup> H-deoxyglucose uptake.	139
Figure 3: Effect of CA, GA, PA and Cat isolated from the active fractions of FJ on the activity of G6Pase (A) and GS (B).	140
Figure 4: Effect of CA, GA, PA and Cat isolated from the active fractions of FJ on <sup>3</sup> H-deoxyglucose uptake.	141

## Liste des abréviations

ACC: Acétyl-CoA carboxylase  
AICAR: 5-Aminoimidazole-4-carboxamide ribonucléotide  
AMPK: AMP-activated protein kinase  
ATPase: Adenosine triphosphate phosphatase  
CAP: Cbl-associated protein  
CREB: c-AMP-response element-binding proteins  
DPP-4: Dipeptidyl peptidase-4  
ET: Ellagitannins  
FA: Fatty acid  
FFA: Free fatty acid  
FOXO: Forkhead transcription factors  
G6P: Glucose-6-phosphate  
G6Pase: Glucose-6-phosphatase  
GI: Gastro-intestinal  
GIP: Glucose-Independent Insulinotropic polypeptide  
GK: Glucokinase  
GLP-1: Glucagon like peptide-1  
GLUT: Glucose transporter  
GS: Glycogène synthétase  
GSK-3: Glycogen synthase kinase-3  
GT: Gallotannins  
HGO: Hypoglycémiant oral  
HNF $\alpha$  -: Hepatic nuclear factor-4 $\alpha$   
HSL: Hormone-sensitive lipase  
IDF: International Diabetes Federation  
IGF-1: Receptor: Insulin-like growth factor-1 receptor  
IL-6: Interleukine-6  
IRR: Insulin receptor-related receptor  
IRS: Insulin receptor substrate

JNK: Jun N-terminal kinase  
 MAPK: Mitogen-activated protein kinase  
 NF- $\kappa$ B: Nuclear Factor Kappa-light-chain-enhancers of activated B cells  
 OMS: Organisation mondiale de la santé  
 PDK1: Phosphoinositide-dependant kinase 1  
 PEPCK: phosphoénolpyruvate carboxykinase  
 PH: Pleckstrin homology  
 PI(3,4,5)P3: Phosphatidylinositol triphosphate  
 PI(4,2)P2: Phosphatidylinositol biphosphate  
 PI3-K: Phosphatidylinositol 3-kinase  
 PP1: Protéine phosphatase 1  
 PPAR $\gamma$ : Peroxisome proliferator-activated receptor- $\gamma$   
 RE: Réticulum endoplasmique  
 RXR: Retinoid X receptor  
 SGLT: Sodium-dependent glucose cotransporters  
 SOHO: Sorbin Homology  
 SOS: Son of sevenless  
 SREBP-1: Steroid regulatory element-binding protein  
 SUR-1: Sulfonylurea receptor  
 TG: Triglycérides  
 TNF- $\alpha$ : Tumor necrosis factor- $\alpha$   
 TZDs: Thiazolidinediones  
 VLDL: Very low density lipoproteins

*À mon magnifique époux Alaa  
et mes anges Nadine & Reem*

## Remerciements

J'aimerais bien remercier et exprimer toute mon appréciation et ma gratitude à mon superviseur, Dr Pierre S. Haddad, pour son aide et sa présence précieuse tout le long de ma période d'études. Ses conseils valorisés, son expérience scientifique et son support moral étaient un motif très important qui m'a aidé pour pouvoir franchir tous les obstacles. Sa confiance en moi et son encouragement constant m'ont aidé dans les périodes difficiles de mes années d'études de maîtrise et doctorat. Je vais toujours garder de très beaux souvenirs de tous les moments que j'ai passés dans son laboratoire.

J'aimerais aussi remercier Diane Vallerand qui a été une personne agréable, très compréhensive et très motivante. Je lui dis un gros merci pour son soutien continu et encourageant ainsi que pour ses conseils scientifiques constructifs.

Je remercie tous les membres de notre laboratoire surtout Hoda et Meriem pour leur aide précieuse, leur amitié et les moments mémorables qu'on a passé ensemble depuis 2009.

Je tiens à remercier nos collaborateurs qui ont fait un grand effort pour rendre mon projet réalisable, surtout Dr John Thor Arnason avec toute son équipe de recherche, Dr Ammar Saleem, Dr Alain Cuerrier, Dr Wilhelmina Kalt, Mélinda Vinqvist, Dr Chantal Matar et Dr Tri Vuong.

Un remerciement spécial et unique sera attribué à mon magnifique époux Alaa à qui je dédie cette thèse. Il m'a supporté depuis le début de mon doctorat et jusqu'à la dernière minute avec amour, tendresse et soutien moral. Son aide précieuse durant les moments les plus difficiles de la rédaction de ma thèse et sa confiance en moi ont rendu ce travail possible et réussi. Je suis très reconnaissante pour tout ce qu'il m'a fait et tout ce qu'il m'a offert afin de réaliser mes objectifs.

J'aimerais remercier mes parents Khaled et Fatima qui grâce à eux je suis arrivée à ce niveau dans mes études. Leur encouragement constant, leur motivation et leur confiance en moi dès le début de mes années de scolarité m'ont poussé pour aller jusqu'au bout et réaliser leur rêve de voir leur fille arrivée à un niveau d'études supérieures. Je leur dit merci d'être les meilleurs parents au monde.



Je vais remercier aussi mon frère Walid, mes sœurs Nadine et Nissrine ainsi que mon oncle Ahmad et ma tante Latifa pour leur amour, leur soutien et leur confiance en moi.

Je tiens à remercier Sylvie Caron pour son travail précieux et son aide constante dans les fonctions administratives. C'est une personne très aimable et sympathique qui sacrifie tout son temps afin d'aider les étudiants.

Je suis très reconnaissante pour les membres du jury qui ont accepté d'évaluer ma thèse et qui ont attribué leur temps pour lire ma thèse et donner leurs commentaires.

Je n'oublie surtout pas tous les membres du département de pharmacologie, professeurs et étudiants, à qui j'exprime mes remerciements sincères.

# Chapitre 1 : Introduction

Le diabète est une maladie chronique qui peut être le résultat d'une diminution de production de l'insuline par les cellules du pancréas ou d'une diminution de l'action de l'insuline au niveau des tissus cibles (Cheng, Iglesias et al. 2009). Selon la fédération internationale de diabète (IDF : International Diabetes Federation) 382 millions de personnes dans le monde sont atteints de diabète, ce nombre va augmenter jusqu'à 592 millions en 2035 (IDF 2013). Selon l'organisation mondiale de la santé (OMS), le diabète va devenir la septième cause de décès au monde en 2030 (WHO 2011).

Plusieurs études montrent que le recours à une alimentation saine, l'exercice physique et le maintien d'un poids corporel normal peuvent prévenir et retarder l'apparition du diabète de type 2. Au Canada près de 9 millions de personnes sont diabétiques ou prédiabétiques, Le risque de développer le diabète de type 2 chez la population autochtone est de 3 à 5 fois plus élevé que le reste de la population canadienne (<http://www.diabetes.ca/diabetes-and-you/what/prevalence/>; Ekoe, Thouez et al. 1990). Leurs habitudes de vie, leur alimentation et leur difficulté d'adaptation à la médecine moderne rendent leur condition de plus en plus difficile. Malgré leur non-reconnaissance « officielle » par les autorités sanitaires occidentales, la médecine traditionnelle et les plantes médicinales en étant issues sont utilisées pour traiter différents syndromes du diabète de type 2. Cette médecine traditionnelle autochtone est héritée des parents et grands-parents et continue à se manifester de nos jours. Depuis 2003, notre équipe a commencé à examiner le potentiel anti-diabétique de certains extraits de plantes utilisées dans la médecine traditionnelle de plusieurs communautés Cris de la région de la Baie James du Nord du Canada. Différentes études récentes de notre groupe se sont concentrées sur la validation de l'effet de 17 plantes médicinales différentes qui avaient le plus de potentiel et qui ont été identifiées après une étude ethnobotanique détaillée (Leduc, Coonishish et al. 2006; Fraser, Cuerrier et al. 2007). Ces extraits de plante ont été testés dans des bioessais dans 2 différentes lignées cellulaires, soit les cellules musculaires squelettiques et les adipocytes pour identifier le potentiel de ces plantes pour améliorer le contrôle de la glycémie (Spor, Martineau et al. 2006; Harbilas, Martineau et al. 2009). En continuité avec les études précédentes, une bonne partie de

cette thèse sera concentrée sur le projet menant à évaluer l'effet des 17 plantes médicinales sur l'homéostasie hépatique de glucose.

## **1.1. Homéostasie de l'énergie**

### **1.1.2. Homéostasie de glucose**

Le glucose est le premier substrat utilisé pour fournir de l'énergie aux différents tissus de l'organisme. Le cerveau qui représente 2% de la masse corporelle utilise 25% du glucose corporel total (Dong, Wang et al. 2003). Dans les conditions physiologiques normales, les individus en bonne santé auront une glycémie normale (glycémie à jeûn autour de 3.5 - 5.6 mmol/L et glycémie post-prandiale autour de 4.40 – 6.94 mmol/L). Le maintien de la glycémie autour des valeurs normales est assuré par plusieurs substances. L'insuline, hormone hypoglycémiante principale sécrétée par les cellules  $\beta$  des îlots de Langerhans du pancréas, joue un rôle crucial en inhibant la production de glucose par le foie, en stimulant sa captation par les tissus périphériques (muscle squelettique et tissu adipeux), et en augmentant son stockage sous forme de glycogène (Saltiel 1996). Le glucagon ainsi que d'autres hormones régulatrices (catécholamines, cortisol et l'hormone de croissance) agissent pour maintenir la glycémie normale durant les phases de jeûne. L'homéostasie de glucose résulte donc d'un équilibre entre son absorption au niveau de l'intestin, sa production par le foie et son utilisation par les tissus périphériques (Beardsall, Diderholm et al. 2008).

#### *1.1.2.1. Le récepteur de l'insuline : différentes voies de signalisation et action*

L'insuline se lie à un récepteur membranaire spécifique qui fait partie de la famille des récepteurs tyrosine kinases incluant le récepteur insulin-like growth factor (IGF-1 receptor) et l'insulin receptor-related receptor (IRR) (Patti and Kahn 1998). Le récepteur à l'insuline est un hétérotétramère constitué de 2 sous-unités extracellulaires  $\alpha$  et 2 sous-unités intracellulaires  $\beta$  (Ward 1999). Une fois que l'insuline se lie à son récepteur, une cascade d'événements se déroule débutant par un changement conformationnel du récepteur, suivi d'une autophosphorylation sur les résidus tyrosine. Ensuite une cascade de phosphorylation de plusieurs protéines et kinases se succèdent (IRS : insulin receptor substrate, PI3-K : phosphatidylinositol 3-Kinase) qui aboutit à l'effet métabolique de l'insuline sur le glucose,

les lipides et le glycogène, ainsi que la synthèse des protéines et l'expression de plusieurs gènes (Saltiel and Kahn 2001; Pirola, Johnston et al. 2004) (Figure 1).

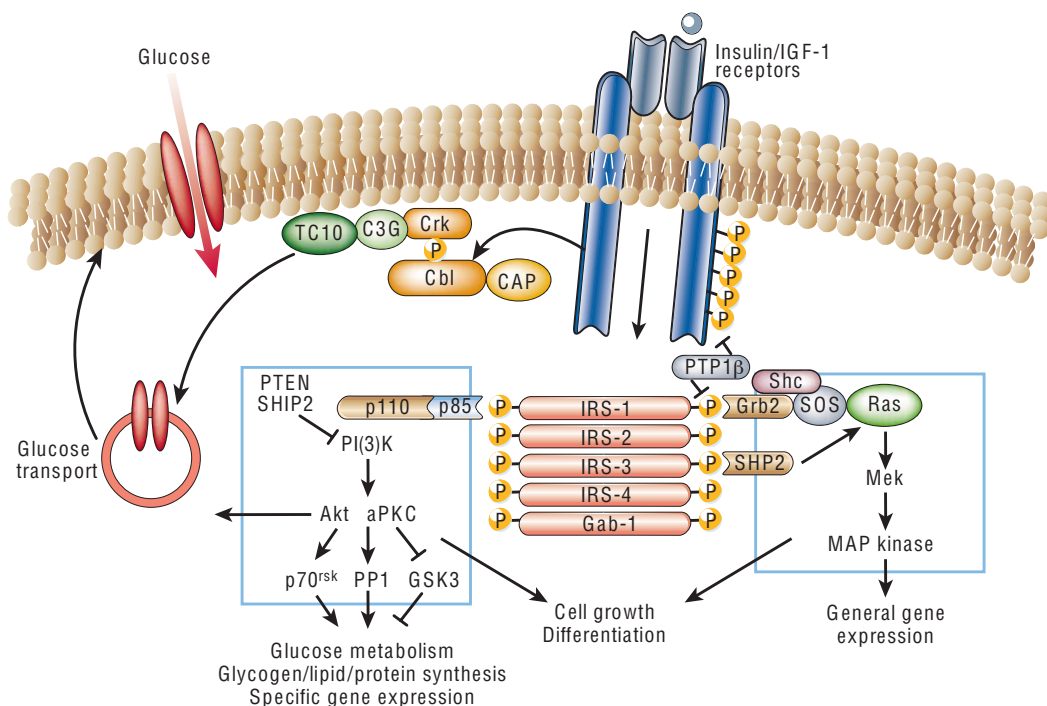


Figure 1 : Les voies de signalisation de l'insuline (tirée de (Saltiel and Kahn 2001)).

#### 1.1.2.2. La voie de signalisation de la PI3-Kinase

C'est la voie responsable des effets métaboliques de l'insuline. La PI3-K consiste en une sous-unité catalytique, la p-110, et une sous-unité régulatrice, la p-85 (Myers, Backer et al. 1992). La liaison de la PI-3K à l'IRS par la sous-unité régulatrice, la p-85, va engendrer la phosphorylation du phosphatidylinositol (4,5) biphosphate (PI(4,5)P<sub>2</sub>) par la sous-unité catalytique, la p-110, pour générer du phosphatidylinositol triphosphate (PI(3,4,5)P<sub>3</sub>). Le PI(3,4,5)P<sub>3</sub> se lie au domaine pleckstrin homology (PH) de différentes protéines et molécules altérant ainsi leur activité (Lietzke, Bose et al. 2000). La phosphoinositide-dependent kinase 1 (PDK1) est une des sérine kinases dont l'activité est régulée par le PI(3,4,5)P<sub>3</sub>. La PDK1 phosphoryle et active la sérine/thréonine kinase Akt/PKB (Alessi, James et al. 1997).

L'Akt/PKB est une protéine kinase importante dans la transmission du signal de la voie de l'insuline et cela par la phosphorylation d'une kinase impliquée dans la voie de la glycogénogenèse, la glycogène synthétase kinase-3 (GSK-3), de certains facteurs de transcriptions comme les forkhead transcription factors (FOXO) et certaines protéines comme les cAMP response element-binding proteins (CREB) (Cross, Alessi et al. 1994; Nakae, Park et al. 1999).

#### *1.1.2.3. La voie de signalisation de Ras-MAPK*

La voie de signalisation de Ras-MAPK est impliquée dans la croissance, la survie et la différenciation cellulaire. Cette voie de signalisation consiste en une phosphorylation de l'IRS par l'IR ensuite d'un recrutement d'une protéine adaptatrice Grb2, qui va recruter la protéine son-of-sevenless (SOS) pour activer Ras, une protéine liant le GTP. Une fois que Ras est activée, elle interagit avec des effecteurs et aboutit à leur activation. Ras initie une cascade de kinases par l'activation étape par étape de Raf, MEK et ERK. L'activation d'ERK permet sa translocation jusqu'au noyau où il active la phosphorylation de plusieurs facteurs de transcription comme le p62, en initiant ainsi la prolifération et la différenciation cellulaire (Boulton, Nye et al. 1991). Le blocage de cette voie de signalisation par l'utilisation d'inhibiteurs pharmacologiques ou de mutants négatifs permet de prévenir la stimulation de la croissance cellulaire par l'insuline mais n'a pas d'effet sur les actions métaboliques de cette hormone (Lazar, Wiese et al. 1995).

#### *1.1.2.4. La voie de signalisation CAP/Cbl/TC10*

Il semble qu'une autre voie de signalisation que celle de la PI3-Kinase est impliquée dans la stimulation du transport de glucose par l'insuline (Pessin and Saltiel 2000). Cette deuxième voie est la voie de CAP/Cbl/TC10. Elle consiste en une phosphorylation du protooncogène Cbl (Ribon and Saltiel 1997). Cbl interagit avec Cbl-associated protein (CAP), une protéine adaptatrice qui fait partie de la famille Sorbin Homology (SoHo) des protéines adaptatrices. CAP se lie à la séquence riche en proline de Cbl via son domaine SH3 carboxy-terminal (Ribon, Herrera et al. 1998). CAP est exprimé dans les tissus sensibles à l'insuline, elle est fortement induite dans les adipocytes durant la différenciation et son expression est augmentée

par l'action des agonistes du peroxisome proliferator-activated receptor- $\gamma$  (PPAR $\gamma$ ) (Ribon, Johnson et al. 1998). Une fois phosphorylé, le complexe Cbl-CAP va transloquer vers le domaine des radeaux lipidiques au niveau de la membrane plasmique via l'interaction du domaine SoHo de CAP avec une protéine des radeaux lipidiques, la flotiline (Baumann, Ribon et al. 2000). Après la translocation du complexe Cbl-CAP, le Cbl phosphorylé va recruter une protéine adaptatrice CrKII vers les radeaux lipidiques suite à l'interaction du domaine SH2 de CrKII avec le phospho-Cbl. CrKII forme un complexe avec la protéine guanyl nucleotide-exchange protein, C3G. Suite à sa translocation vers les radeaux lipidiques, la C3G se rapproche de la protéine G et catalyse l'échange GDP pour le GTP, ce qui résulte en une activation de la protéine TC10 (Chiang, Baumann et al. 2001). La localisation de TC10 au niveau des radeaux lipidiques est requise pour son activation par l'insuline (Watson, Shigematsu et al. 2001). La voie de TC10 avec la voie de PI3-K stimulent le recrutement et la translocation des vésicules contenant les transporteurs de glucose GLUT4 et leur fusion avec la membrane plasmique (Saltiel and Kahn 2001). Cette voie de signalisation de TC10 a été décrite au début dans les adipocytes 3T3-L1, mais plus tard une étude a démontrée que la voie de Cbl/CAP/TC10 est active dans le muscle cardiaque et qu'elle est altérée avec l'obésité et la déficience en insuline (Gupte and Mora 2006).

#### *1.1.2.5. Production hépatique de glucose : Néoglucogenèse*

La néoglucogenèse est la voie essentielle de production de glucose dans le foie à partir de précurseurs comme les acides aminés, le lactate, le glycérol et le pyruvate. Cette voie est surtout activée dans le foie suite à un jeûne et chez les patients diabétiques (Watford 2005). Elle comporte plusieurs réactions enzymatiques qui s'enchainent pour produire du glucose et le libérer dans la circulation sanguine (Figure 2). Il existe trois points de contrôle de cette voie qui sont les réactions catalysées par les trois enzymes suivantes : la phosphoénolpyruvate carboxykinase (PEPCK), la fructose-1,6-biphosphatase et la glucose-6-phosphatase (G6Pase). Ces trois enzymes font l'objet d'une régulation hormonale. Suite à l'ingestion d'un repas, l'insuline tend à normaliser le niveau de glucose dans le sang, en partie en inhibant la voie de la néoglucogenèse dans le foie. Cet effet est expliqué par l'inhibition de la transcription des gènes responsables de l'expression de deux des trois enzymes clefs de la voie de la

néoglucogenèse, soit la G6Pase et la PEPCK. Chez les patients diabétiques, l'hyperglycémie observée à jeûn est en bonne partie la conséquence d'une augmentation de la production hépatique du glucose qui est due à la résistance à l'insuline (Rosella, Zajac et al. 1993; Mues, Zhou et al. 2009). La dernière étape de la néoglucogenèse consiste en la libération de glucose dans la circulation à partir du glucose-6-phosphate (G6P) et de phosphate inorganique (Pi) dans le réticulum endoplasmique (Figure 3). Cette étape est catalysée par la G6Pase et elle considérée comme l'étape limitante de la néoglucogenèse (Schmoll, Walker et al. 2000). La G6Pase est une enzyme localisée dans le réticulum endoplasmique (RE) du foie, du rein et de l'intestin et qui aboutit à la libération du glucose finale dans le sang. Elle est responsable de la dernière étape de la voie de néoglucogenèse et de la voie de glycogénolyse. La sous-unité catalytique de cette enzyme est reliée à différents transporteurs, le T1 qui est responsable du transport du G6P et qui assure son passage à travers la membrane du RE, le T2 qui assure la sortie du Pi et le T3 responsable du transport de glucose (Gonzalez-Mujica, Motta et al. 2005) (Figure 3). Cette enzyme joue un rôle critique dans le maintien de la glycémie normale. Une mutation au niveau du gène de cette enzyme aboutit à une hypoglycémie, mais une augmentation de son expression est suivie d'une hyperglycémie et de l'apparition des symptômes de diabète (Hutton and O'Brien 2009).

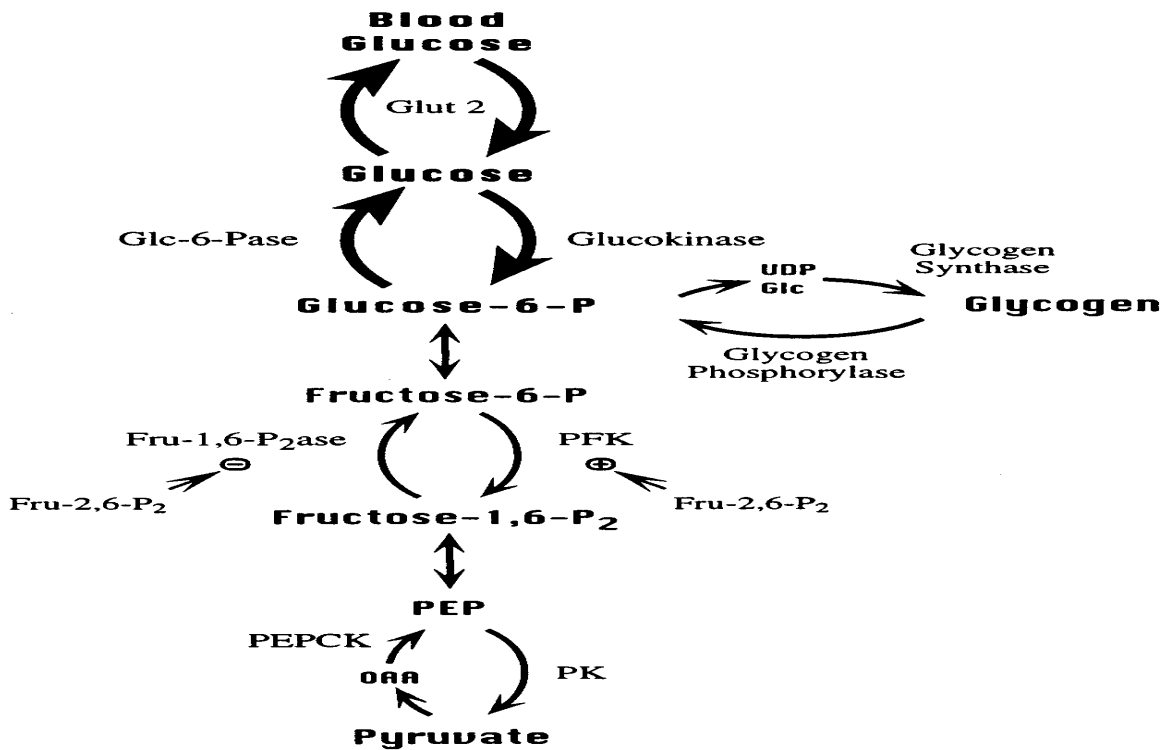


Figure 2 : Les différentes réactions enzymatiques et points de contrôle de la voie de la néoglucogénèse (tirée de (Nordlie, Foster et al. 1999)).

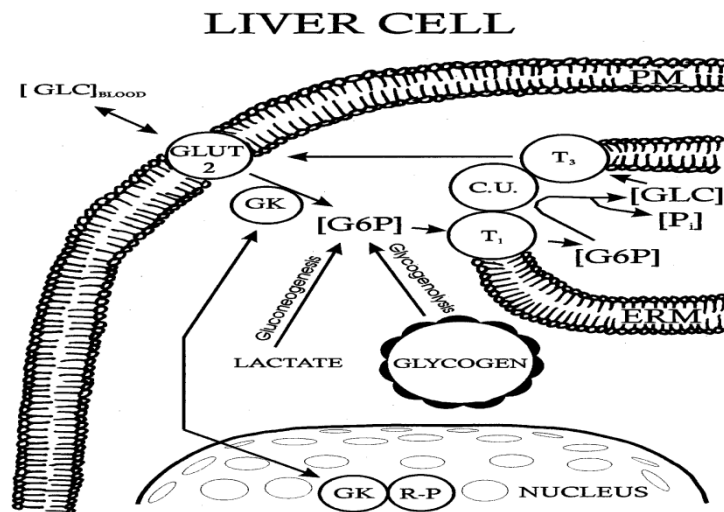


Figure 3 : Localisation de la G6Pase dans la cellule hépatique et schématisation de la dernière étape de la néoglucogénèse (tirée de (Nordlie, Foster et al. 1999)).



#### *1.1.2.6. Glycolyse*

Suite à un repas, le taux de glucose dans le sang augmente impliquant un changement dans le niveau des hormones réglant l'homéostasie de glucose. Le taux de glucagon diminue alors que celui de l'insuline augmente. La voie de l'insuline active par la suite la transcription des gènes impliqués dans l'expression de certaines enzymes comme la glucokinase (GK) et la pyruvate kinase. La GK active la phosphorylation de glucose en G6P. Cette étape étant considérée comme la première étape dans la glycolyse ainsi que le stockage de glucose sous forme de glycogène (Figure 2) (Pilkis and Granner 1992).

#### *1.1.2.7. Stockage de glucose sous forme de glycogène dans le foie et le muscle : Glycogénogenèse*

Une autre voie impliquée dans l'homéostasie de glucose et régulée par la voie de signalisation de l'insuline est la voie de stockage de glucose sous forme de glycogène qui se produit dans le foie et le muscle squelettique. La glycogène synthétase (GS) est l'enzyme qui catalyse l'étape limitante de la glycogénogenèse; elle est régulée par une kinase importante, la glycogène synthétase kinase-3 (GSK-3). Cette dernière est une sérine/thréonine kinase impliquée dans plusieurs maladies comme le diabète, le cancer, l'inflammation et l'Alzheimer (Martinez, Castro et al. 2002). La GSK-3 phosphoryle la GS et l'inhibe; ce qui diminue la synthèse de glycogène dans le foie et le muscle (Wang and Roach 1993). Suite à l'activation de la voie PI3K de l'insuline, l'Akt inhibe la GSK-3 (mécanisme de phosphorylation) (Cross, Alessi et al. 1995) et active la protéine phosphatase 1 (PP1) (Brady, Nairn et al. 1997). Ceci aboutit à l'activation de la GS et l'augmentation du stockage de glucose sous forme de glycogène (Cross, Alessi et al. 1995).

#### *1.1.2.8. Glycogénolyse*

Contrairement à la glycogénogenèse, la glycogénolyse est stimulée par le glucagon durant les périodes de jeûne et inhibée par l'insuline. Elle aboutit à la libération de G6P à partir des chaînes de glycogène sous l'action de la glycogène phosphorylase. Ce G6P va servir de

précurseurs pour la G6Pase afin de produire du glucose par la voie de la néoglucogenèse ou bien va être hydrolysé par glycolyse pour fournir de l'énergie sous forme de molécules d'ATP (Petersen, Cline et al. 2001).

### **1.1.3. Transport de glucose**

Le glucose absorbé au niveau intestinal sera distribué aux différents tissus périphériques afin de l'utiliser comme source d'énergie et maintenir les différents organes fonctionnels. C'est une molécule polaire qui ne peut pas diffuser à travers la bicouche lipidique des membranes cellulaires d'où la nécessité de transporteurs spécifiques (Olson and Pessin 1996).

#### *1.1.3.1. Variétés des transporteurs de glucose*

Les transporteurs de glucose sont de 2 types : les cotransporteurs glucose sodium dépendant (SGLT) responsables du transport actif et les transporteurs de glucose (GLUT) responsables du transport facilité. Les SGLT sont surtout exprimés au niveau de l'intestin et des reins; ils assurent le transport actif de glucose contre son gradient de concentration en utilisant l'énergie dérivée du co-transport de sodium (Shepherd and Kahn 1999).

Les GLUT sont une famille de 14 protéines structurellement apparentées (GLUT1-14). Ils sont codés par des gènes distincts et distribués dans les différents organes (Augustin 2010; Thorens and Mueckler 2010; Rao, Shashidhar et al. 2013) (Figure 4). Les GLUT4 sont les principaux transporteurs de glucose sensibles à l'insuline, ils se trouvent essentiellement dans les cellules musculaires squelettiques, les cellules musculaires cardiaques et les adipocytes (James, Strube et al. 1989).

GLUT	Class	Primary site of expression	Affinity to glucose
GLUT-1	I	All fetal tissues, erythrocytes, brain	High affinity (+ + +)
GLUT-2	I	Liver, pancreas, intestine	Low affinity (+)
GLUT-3	I	Neurons, kidney, testis, placenta	Highest affinity (+ + + +)
GLUT-4	I	Adipose tissue, skeletal muscle, cardiac muscle	Moderate affinity (+ +)
GLUT-5	II	Small intestine, testis, kidney	Fructose uptake (+)
GLUT-6	III	Brain, spleen, leucocytes	Low affinity (+)
GLUT-7	II	Liver, small and large intestine, testis, prostate	High affinity for glucose and fructose (+++)
GLUT-8	III	Testis, brain	High affinity (+++) also fructose, galactose
GLUT-9	II	Liver, kidney, intestine	Uric acid uptake
GLUT-10	III	Ubiquitous	Unknown
GLUT-11	II	Pancreas, kidney, placenta	Low affinity for glucose, high for fructose
GLUT-12	II	Heart, prostate	Unknown
GLUT 13-14		Newer proteins-Roles to be determined	

Tableau 1 : Distribution des différents transporteurs de glucose (GLUT) (tiré de (Rao, Shashidhar et al. 2013)).

#### *1.1.3.2. Régulation du transport de glucose par la voie de signalisation de l'insuline*

Les GLUT4 se trouvent dans des vésicules qui circulent continuellement à partir de l'espace intracellulaire vers la membrane cytoplasmique. L'insuline stimule la translocation des GLUT4 vers la membrane cytoplasmique, leur exocytose et diminue leur internalisation pour augmenter, par ce mécanisme, le transport de glucose chez les cellules musculaires et les adipocytes (Pessin, Thurmond et al. 1999) (Figure 4). Une fois que le glucose est transporté dans la cellule il sera phosphorylé sous l'action de la glucokinase pour donner du G6P. Le G6P résultant servira alors de substrat pour l'enzyme GS retrouvée dans les cellules musculaires afin de synthétiser le glycogène, ou sera métabolisé par la voie de la glycolyse pour fournir de l'énergie à la cellule (Roach 2002).

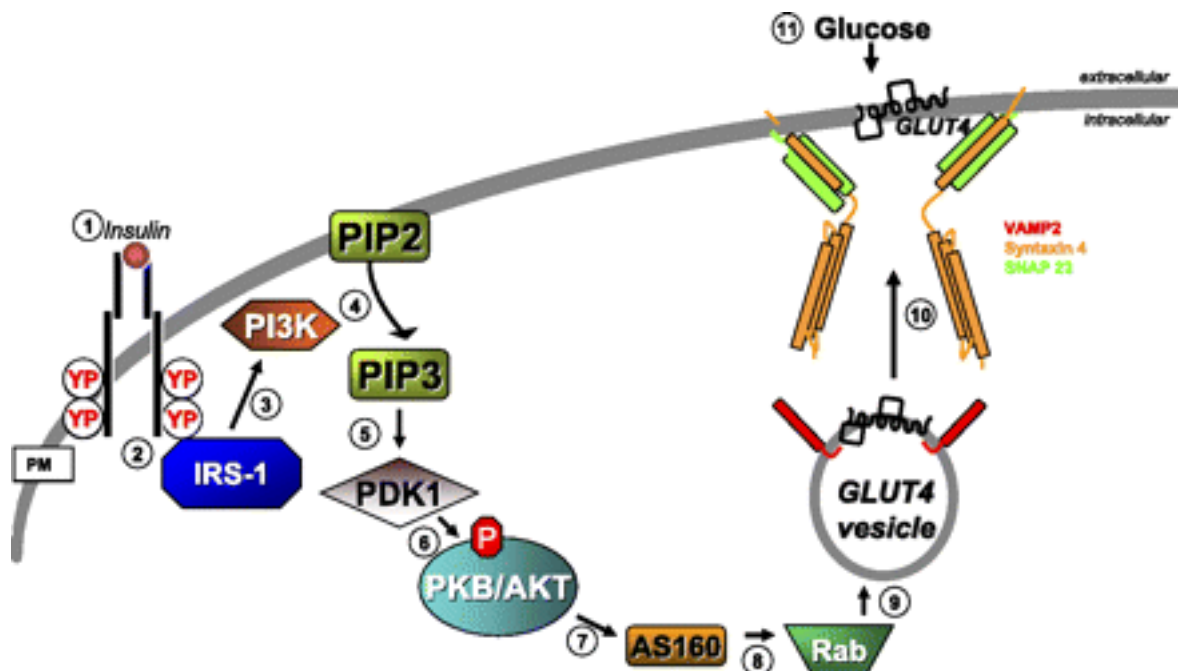


Figure 4 : Activation de la translocation des transporteurs GLUT4 vers la membrane cytoplasmique et augmentation du transport de glucose dans les cellules musculaires suite à la stimulation par la voie de signalisation de l'insuline (tirée de (Jewell, Oh et al. 2010)).

#### 1.1.3.3. Autre voie de régulation : voie de l'AMPK

Mis à part la voie de signalisation de l'insuline, l'homéostasie du glucose est régulée par d'autres facteurs impliqués dans l'homéostasie énergétique. L'AMP-activated protein kinase (AMPK) est une enzyme importante dans cette voie; elle est composée de 3 sous-unités  $\alpha$ ,  $\beta$  et  $\gamma$ . Cette protéine kinase possède aussi un site Thr/172 qui est son principal site de phosphorylation par d'autres kinases aboutissant ainsi à son activation (Wong and Lodish 2006). L'AMPK est activée suite à un stress métabolique (augmentation du ratio AMP/ATP dans la cellule) (Towler and Hardie 2007). Une fois phosphorylée, elle inhibe les voies anaboliques (diminution de la synthèse des acides gras, diminution de la néoglucogenèse, et augmentation du stockage de glucose sous forme de glycogène) et active les voies cataboliques (augmentation du transport de glucose dans les muscles, l'oxydation des acides gras et la glycolyse) (Viollet, Andreelli et al. 2003).

Dans le muscle squelettique, l'AMPK active la translocation des GLUT4 vers la membrane cytoplasmique et augmente par la suite le transport de glucose par un mécanisme différent de celui de la voie insulino-dépendante. La p38 MAPK semble être activée par plusieurs stimulateurs de l'AMPK comme AICAR (5-Aminoimidazole-4-carboxamide ribonucleotide) et les découpleurs mitochondriaux. Ce mécanisme semble être responsable de l'effet de l'AMPK sur l'activation des GLUT4 présents sur la surface cellulaire (Lemieux, Konrad et al. 2003). L'AMPK diminue aussi la néoglucogenèse essentiellement en inhibant certains facteurs de transcription responsables de l'expression des enzymes clefs comme la PEPCK et la G6Pase. Ces facteurs de transcription regroupent les c-AMP-response element-binding protein (CREB), l'hépatocyte nuclear factor-4 $\alpha$  (HNF-4 $\alpha$ ) et la famille des forkhead (FOXO1) (Hwang, Kwon et al. 2009).

L'AMPK est activée par la metformine, un des médicaments hypoglycémisants oraux le plus utilisé au monde pour contrôler le diabète et les syndromes métaboliques (Viollet, Mounier et al. 2007).

#### **1.1.4. Métabolisme des lipides et régulation**

Mis à part le métabolisme de glucose, l'insuline est aussi impliquée dans le métabolisme des lipides; elle active leur synthèse et inhibe leur dégradation. Des études ont montré que l'activation d'un facteur de transcription, le steroid regulatory element-binding protein (SREBP-1c), semble être impliqué dans la plupart de ces mécanismes (Shimomura, Bashmakov et al. 1999). L'insuline active le transport de glucose dans le tissu adipeux ainsi que les enzymes de synthèse des lipides, comme la pyruvate déshydrogénase, la fatty acid synthase et l'acétyl-CoA carboxylase (ACC). En même temps, l'insuline inhibe la lipolyse dans les adipocytes et cela en inhibant l'enzyme clef dans ce processus, l'hormone-sensitive lipase (HSL) (Anthonsen, Ronnstrand et al. 1998). Dans le tissu adipeux, le glucose rentre dans la voie de glycolyse et se transforme en dihydroxyacétone-P qui sera par la suite transformé en glycérol-3P par l'action de la glycérolphosphate déshydrogénase. Le glycérol-3P ainsi formé sert à estérifier les acides gras afin de synthétiser les triglycérides qui seront par la suite stockés comme source d'énergie (Ballard, Hanson et al. 1967; Reshef, Olswang et al. 2003).

## **1.2. Diabète**

### **1.2.1 Définition et prévalence**

Le diabète est une maladie chronique qui touche présentement 382 millions personnes au monde. Ce nombre est prévu augmenter jusqu'à 592 millions en 2035. 80% des patients diabétiques vivent dans des pays à faible ou moyen revenu et sont âgés entre 40 et 59 ans (IDF 2013). Le diabète est caractérisé par une augmentation de la concentration de glucose circulant avec des anomalies au niveau du métabolisme des hydrates de carbone, des lipides et des protéines (WHO 1999). Il résulte soit d'une déficience au niveau de la sécrétion d'insuline par les cellules pancréatiques ou de l'action de l'insuline au niveau des tissus cibles ou bien des 2 ensembles (Cavaghan, Ehrmann et al. 2000). Une personne en bonne santé devrait avoir une glycémie à jeûn inférieure à 5.6 mmol/L. Toute augmentation de cette valeur pourra représenter un risque de développer une intolérance au glucose ou le diabète et devra être bien surveillée (WHO 1999). Les symptômes bien connus du diabète sont : polyurie, soif, perte de poids, fatigue, manque de concentration et vision floue (IDF 2013).

### **1.2.2. Types et classification**

Il existe essentiellement 3 types de diabète : le diabète de type 1, le diabète de type 2 et le diabète gestationnel. D'autres types de diabète existent aussi et sont regroupés sous la catégorie « autres types spécifiques de diabète ».

#### *1.2.2.1 Diabète de type 1*

Le diabète de type 1 résulte d'une destruction auto-immune des cellules  $\beta$  du pancréas qui secrètent l'insuline (Efrat 2008). Les patients atteints de ce type de diabète produisent très peu ou presque pas d'insuline; ils ont besoin d'injection d'insuline à tous les jours pour pouvoir réguler leur glycémie. Cette maladie peut toucher les personnes de tout âge mais affecte surtout les enfants et les jeunes adultes (IDF 2013).

#### *1.2.2.2. Diabète de type 2*

Le diabète de type 2 représente presque 90% des cas de diabète au monde. Il est caractérisé par une diminution de la sensibilité à l'insuline au niveau des tissus cibles comme le foie, le muscle et le tissu adipeux, et d'une diminution de la sécrétion d'insuline par les cellules pancréatiques (Cheng, Iglesias et al. 2009). Cette maladie est souvent mais pas toujours associée avec l'obésité. Cette dernière pourra elle-même causer une résistance à l'insuline et engendrer par la suite une augmentation du taux de glucose dans le sang. Les patients atteints de ce type de diabète peuvent améliorer leur condition de vie par l'exercice avec une bonne diète mais auront souvent recours aux médicaments anti-diabétiques ou, dans les cas plus avancés, aux injections d'insuline (IDF 2013).

#### *1.2.2.3. Diabète gestationnel*

C'est une forme de diabète caractérisée par une hyperglycémie chez la femme pendant la période de grossesse. Il se développe chez presque 4% des femmes enceintes dans le monde. Le diabète gestationnel disparaît en général après l'accouchement mais les femmes ainsi que leur bébés présenteront un risque de développer le diabète de type 2 plus tard dans leur vie (Kim and Lee 2005; IDF 2013).

### **1.2.3. Physiopathologie du diabète de type 2**

Le diabète de type 2 est une maladie polygénique où des anomalies génétiques sont à la base de la résistance à l'insuline et de la diminution de sa sécrétion (Stern 2000). Des facteurs environnementaux, de mauvaises habitudes de vie, une alimentation riche en calories ainsi que l'obésité peuvent contribuer au développement de la maladie (Hamman 1992). Le profil observé est une altération au niveau de la sécrétion de l'insuline et de son action au niveau des tissus cibles surtout au niveau de la production hépatique de glucose et de son transport dans les muscles (Weyer, Hanson et al. 2000).

### *1.2.3.1. Résistance à l'insuline*

Un syndrome métabolique peut être diagnostiqué quand 3 ou plus des paramètres suivants coexistent chez un patient : hyperglycémie à jeûn, obésité abdominale (mesurée par le tour de taille), dyslipidémie (hypertriglycéridémie ou hypercholestérolémie) et hypertension (Reaven 2002). La résistance à l'insuline est la cause principale de ces dysfonctionnements et elle est considérée un facteur de risque principal dans le développement du diabète de type 2 ainsi que dans celui des maladies cardiovasculaires (Silfen, Manibo et al. 2001). Nous parlons de résistance à l'insuline quand des valeurs normales d'insuline sécrétée par les cellules du pancréas n'arrivent pas à générer une réponse adéquate au niveau des tissus périphériques. Les cellules pancréatiques sécrètent l'insuline de plus en plus pour compenser ce dysfonctionnement ce qui mène à une hyperinsulinémie suivie d'un épuisement de ces cellules (Bonner-Weir 2000). La résistance à l'insuline se produit principalement en raison de l'obésité, l'excès calorique, l'inactivité physique, les facteurs génétiques et l'âge. Elle est associée à de nombreuses maladies graves telles que le diabète de type 2, l'hypertension, l'athérosclérose et le syndrome métabolique (Reaven 1988; Boden 2011). Elle est caractérisée par une diminution au niveau de la concentration ainsi que la phosphorylation des IRS-1 et -2, de l'activité de la PI3-K, de la translocation des transporteurs de glucose et de l'activité des enzymes intracellulaires impliquées (Pessin and Saltiel 2000).

#### *1.2.3.1.1. Obésité et lipotoxicité*

L'obésité est un problème majeur de santé et une cause principale dans l'apparition de la résistance à l'insuline. L'accumulation de matière grasse au niveau de l'abdomen (obésité abdominale ou centrale) est plus dangereuse que celle au niveau sous-cutané (Stienstra, Duval et al. 2007). Le tissu adipeux est incapable de stocker l'excès de calories sous forme de triglycérides ce qui engendre leur stockage dans d'autres tissus comme le foie et le muscle. Le stockage ectopique des lipides et de leurs métabolites engendre des anomalies cellulaires comme l'apoptose, le stress oxydatif, le stress du reticulum endoplasmique ainsi que des détériorations dans la fonction cellulaire (Abel, O'Shea et al. 2012). L'accumulation ectopique des triglycérides ainsi que l'augmentation du taux d'acides gras circulants aggravent la



résistance à l'insuline et cela en inhibant le transport de glucose, son oxydation et la synthèse de glycogène et en augmentant la production hépatique de glucose (Bergman and Ader 2000) (Figure 5). Le taux élevé d'acides gras libres est aussi associé à une diminution de la phosphorylation de l'IRS-1 et de l'activité de la PI3-K (Shulman 2000). Les métabolites des lipides comme le diacylglycérol et les céramides activent la protéine kinase C- $\Phi$  (Itani, Ruderman et al. 2002; Boden 2011), une sérine/thréonine kinase qui peut inhiber la voie de signalisation de l'insuline en augmentant la phosphorylation au niveau du résidu sérine des IRS (Yu, Chen et al. 2002).

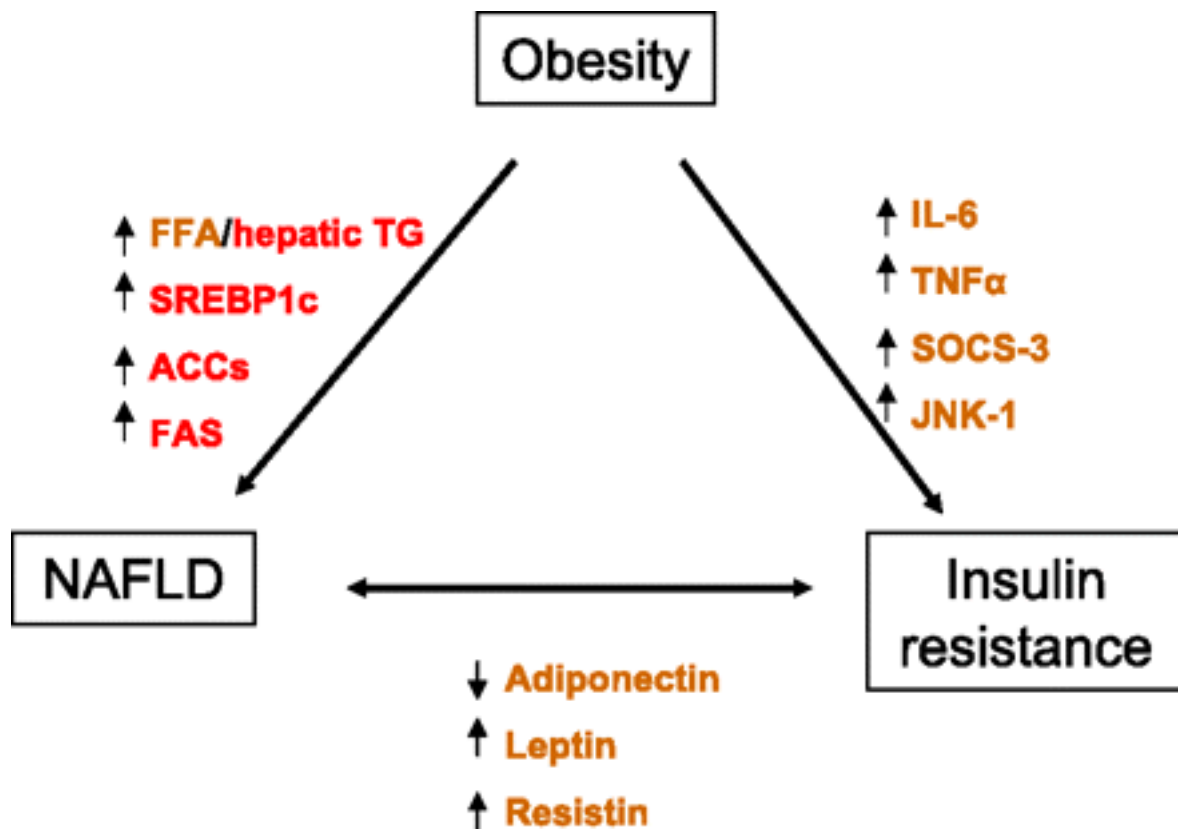


Figure 5 : Obésité, lipotoxicité et résistance à l'insuline (tirée de (Chiang, Pritchard et al. 2011)).

#### *1.2.3.1.2. Tissu adipeux et sécrétion endocrinienne*

Mis à part son rôle dans le stockage des lipides, le tissu adipeux produit et secrète de nombreuses hormones appelées les adipokines. Le terme adipokine réfère en général à toute protéine produite et sécrétée par les adipocytes. Les plus connues sont : la leptine, l'adiponectine et la résistine. D'autres cytokines sont aussi sécrétées par le tissu adipeux comme le tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) et l'interleukine-6 (IL-6) (Fain, Madan et al. 2004; Trayhurn and Wood 2004). Dans les conditions physiologiques normales, les adipokines jouent un rôle important dans le métabolisme des glucides et des lipides ainsi que dans l'homéostasie énergétique (Saltiel and Kahn 2001). De nombreuses études ont montré que la production des adipokines est altérée dans les cas d'obésité, de diabète de type 2 et de syndrome métabolique (Bastard, Maachi et al. 2006).

##### *1.2.3.1.2.1. Leptine*

La leptine est le produit du gène *ob*. Elle est produite et sécrétée par le tissu adipeux blanc et plus précisément par les adipocytes différenciés (Ahima and Flier 2000). Elle agit au niveau du système nerveux central pour diminuer la prise de nourriture et augmenter les dépenses énergétiques; tout cela aboutissant à une perte de poids (Saltiel and Kahn 2001). Elle agit en stimulant l'oxydation des acides gras, l'augmentation du transport de glucose et en inhibant l'accumulation ectopique des lipides. Ceci aide à améliorer la sensibilité à l'insuline. Malgré l'augmentation du taux de leptine dans le cas d'obésité, la sensibilité à l'insuline ne s'améliore pas. Ceci suggère que les personnes obèses développent une résistance à la leptine (Zimmet, Hodge et al. 1996).

##### *1.2.3.1.2.2. Adiponectine*

L'adiponectine est hautement exprimée dans le tissu adipeux avec des particularités qui la distinguent des autres adipokines. Le taux d'adiponectine circulante est bas chez les patients obèses et/ou diabétiques ainsi que les patients souffrant de maladies cardiovasculaires. En effet, la concentration d'adiponectine est corrélée positivement à la sensibilité à l'insuline et

joue un rôle de protection contre la résistance à l'insuline et l'athérosclérose. Son action insulino-sensibilisatrice implique une activation de l'AMPK qui régule les concentrations cellulaires du malonylCoA suite à l'inhibition de l'ACC. Cette inhibition résulte en une diminution de la lipogenèse associée à une augmentation de la bêta-oxydation des acides gras au niveau des mitochondries (Yamauchi, Kamon et al. 2002). En plus, l'adiponectine diminue la production hépatique de glucose en diminuant l'expression de l'ARNm des deux enzymes clefs de la néoglucogenèse, la PEPCK et la G6Pase (Kadowaki and Yamauchi 2005). Des études effectuées chez des animaux et des êtres humains ont montré que certains anti-diabétiques oraux comme les thiazolidinediones sont capables d'augmenter les concentrations d'adiponectine (Lindsay, Funahashi et al. 2002). Un effet similaire a été découvert pour le jus de bleuet fermenté préparé dans notre laboratoire (Vuong, Benhaddou-Andaloussi et al. 2009). L'adiponectine peut aussi moduler la réaction inflammatoire en diminuant la sécrétion du TNF- $\alpha$  par les macrophages (Ouchi, Kihara et al. 2000).

#### *1.2.3.1.2.3. Résistine*

En essayant de trouver une nouvelle cible pour les thiazolidinediones dans les adipocytes, Steppan *et.al* ont découvert la résistine (Steppan, Bailey et al. 2001) qui joue un rôle important dans l'inflammation et la réaction immunitaire (Tilg and Moschen 2006). Chez les rongeurs, la résistine est sécrétée principalement par le tissu adipeux et elle est impliquée dans le développement de la résistance à l'insuline (Steppan, Bailey et al. 2001; Koerner, Kratzsch et al. 2005). Chez l'humain, La résistine est produite et relâchée par le tissu adipeux, la glande mammaire, le cœur, le cerveau, les poumons ainsi que le tractus gastro-intestinal (Pantsulaia, Livshits et al. 2007). Elle joue un rôle dans le développement de l'inflammation. Il existe plusieurs études contradictoires sur l'implication de la résistine dans le développement de la résistance à l'insuline et l'obésité. Des études effectuées par une équipe de recherche avec des lignées cellulaires différentes ont montré que la résistine induit une apoptose au niveau des cellules  $\beta$  du pancréas (Gao, Zhao et al. 2009) et peut phosphoryler l'Akt, ce qui engendre une atténuation au niveau de la voie de signalisation de l'insuline (Gao, Chang Chua et al. 2007).

#### *1.2.3.1.3. Inflammation et résistance à l'insuline*

L'obésité est associée à une inflammation systémique chronique. En fait, elle est accompagnée d'une augmentation des concentrations des cytokines inflammatoires comme l'IL-6 et le TNF- $\alpha$ . L'accumulation des triglycérides dans les adipocytes induit une hypertrophie et une mort cellulaire ainsi qu'un stress au niveau du réticulum endoplasmique. Ce phénomène aboutit à une infiltration massive des cellules immunitaires comme les macrophages, les neutrophiles et les lymphocytes-T (Gallagher, Leroith et al. 2010). Une interaction croisée entre les adipocytes et les macrophages se produit et aboutit à la production des cytokines inflammatoires et la leptine ainsi qu'à la diminution de la production de l'adiponectine (Lee, Wu et al. 2010). La production du TNF- $\alpha$  par les macrophages stimule la libération des acides gras libres suite à la lipolyse. Les acides gras libres semblent être un ligand pour le récepteur Toll-like présents sur la surface des macrophages. Ces récepteurs activent la voie du NF- $\kappa$ B (nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells), D'où un cercle d'inflammation est initié impliquant les adipocytes et les macrophages. En plus, les cytokines inflammatoires et les acides gras libres passent dans la circulation sanguine et affectent le métabolisme des glucides et des lipides. Il a été démontré que l'inflammation résultante de l'obésité, en particulier la production des cytokines inflammatoires, est associée à l'apparition de certaines complications comme la résistance à l'insuline et le diabète de type 2 (Clement and Langin 2007) (Figure 6). En fait, les cytokines inflammatoires altèrent la voie de signalisation de l'insuline en activant certaines kinases comme la Jun N-terminal kinase (JNK) qui augmente la phosphorylation des IRS au niveau du résidu sérine (Samuel and Shulman 2012). De plus, il a été démontré que les cytokines inflammatoires induisent l'expression d'une protéine enzymatique, l'oxyde nitrique synthase inductible (iNOS), dont l'expression a été fortement reliée à l'induction de la résistance à l'insuline dans le muscle et le tissu adipeux (Kapur, Marcotte et al. 1999; Perreault and Marette 2001; Marette 2003). Un des mécanismes responsables de cette résistance à l'insuline au niveau du muscle squelettique a été relié à l'induction d'une nitration au niveau des résidus tyrosine de l'IRS-1 par l'iNOS (Pilon, Charbonneau et al. 2010).

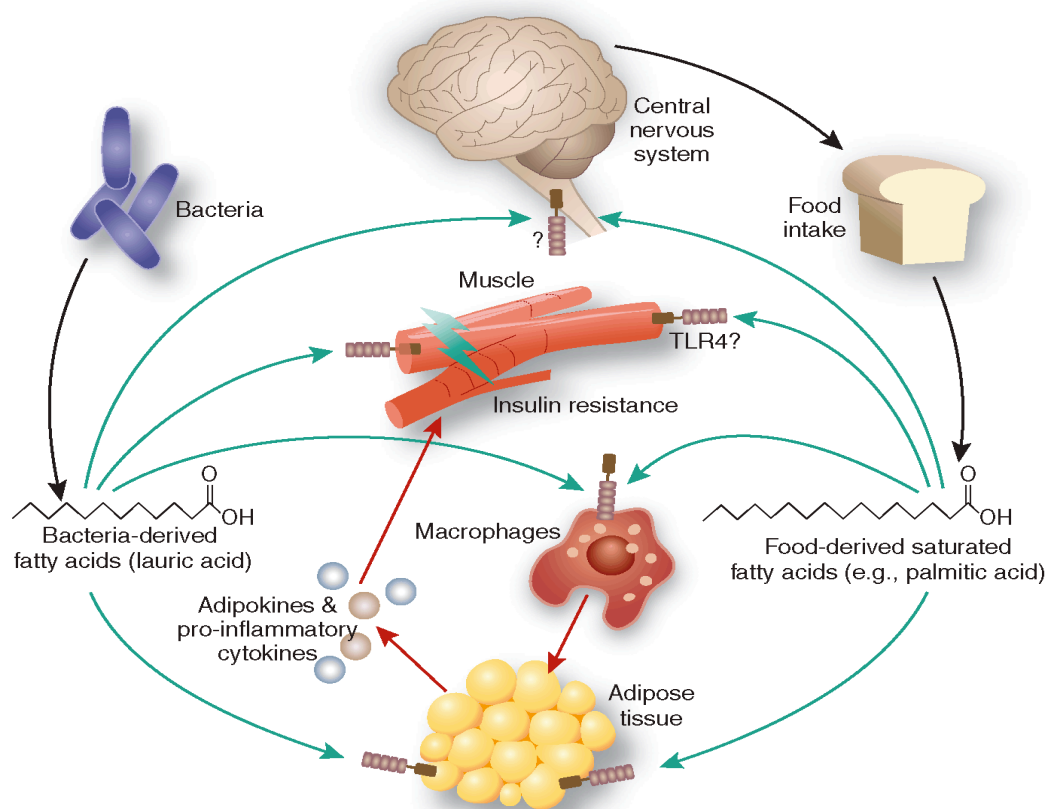


Figure 6: Le '*cross-talk*' entre les différents organes et l'apparition de la résistance à l'insuline (tirée de (Tschop and Thomas 2006)).

#### 1.2.4. Complications du diabète

Le diabète est une maladie associée à plusieurs complications du type microvasculaire et macrovasculaire. Ces complications résultent de plusieurs facteurs mais surtout de l'hyperglycémie chronique chez les diabétiques. Les complications microvasculaires comprennent la rétinopathie, la néphropathie et la neuropathie. Les complications macrovasculaires sont les plus dangereuses et souvent la cause de mortalité chez les diabétiques. Elles comprennent les accidents cérébrovasculaires, les complications vasculaires périphériques et l'infarctus du myocarde (Edelman, Garg et al. 2007). Le stress oxydatif qui est caractérisé par une production excessive des espèces réactives de l'oxygène (ROS : reactive oxygen species) et une diminution des substances anti-oxydantes semble jouer un rôle

important dans le développement des complications du diabète. Ainsi l'hyperglycémie induit une augmentation de la production des ROS par les mitochondries. Cette production massive entraîne l'activation de certaines voies majeures impliquées dans le développement des complications : la voie des polyols, les produits de glycation avancée (AGE), l'activation de la protéine Kinase C (PKC) et la voie des hexosamines (Araki and Nishikawa 2010; Giacco and Brownlee 2010).

## **1.2.5. Traitements du diabète de type 2**

### *1.2.5.1. Alimentation et style de vie*

Avoir une bonne alimentation et de saines habitudes de vie est important dans la prévention et le traitement du diabète de type 2. Ainsi la perte de poids, l'entraînement continu, la diète riche en fibres et faible en gras, l'arrêt de tabac et la réduction de la consommation d'alcool ont été associés à une diminution du risque de développer le diabète de type 2 (Klein, Sheard et al. 2004). L'exercice physique induit une amélioration de l'action de l'insuline surtout au niveau des muscles en augmentant le transport de glucose (Hawley and Lessard 2008).

### *1.2.5.2. Traitement pharmacologique : variété et classes des médicaments hypoglycémiants*

Certains patients ont de la difficulté à effectuer des changements du style de vie. D'autres ne présentent pas une amélioration de leur état de santé avec l'exercice et la saine l'alimentation. Ces patients ont donc besoin d'être traités par des médicaments hypoglycémiants ou des injections d'insuline pour contrôler leur taux de glucose.

Les principales classes d'agents hypoglycémiants oraux (HGO) comprennent les insulinosécrétagogues qui augmentent la sécrétion d'insuline (les sulphonylurés et les glitinides), les insulinosensibilisateurs (les biguanides et les thiazolidinediones), les inhibiteurs de la digestion et l'absorption intestinale des carbohydrates (les inhibiteurs de l' $\alpha$ -glucosidase) (Krentz and Bailey 2005) et la plus récente classe d'antidiabétiques mimant l'effet incrétine

(les analogues de glucagon like peptide-1 : GLP-1 et les inhibiteurs de la dipeptidyl peptidase-4 :DPP-4) (Verspohl 2009) (Figure 7). Une toute nouvelle classe d'HGO, les inhibiteurs des transporteurs sodium-glucose de type 2 (SGLT2), a été récemment découverte et dont quelques médicaments sont rendus à la phase clinique. La sélection initiale de la classe d'hypoglycémiant est toujours basée sur une étude détaillée des caractéristiques chimiques et biochimiques du patient (Krentz and Bailey 2005).

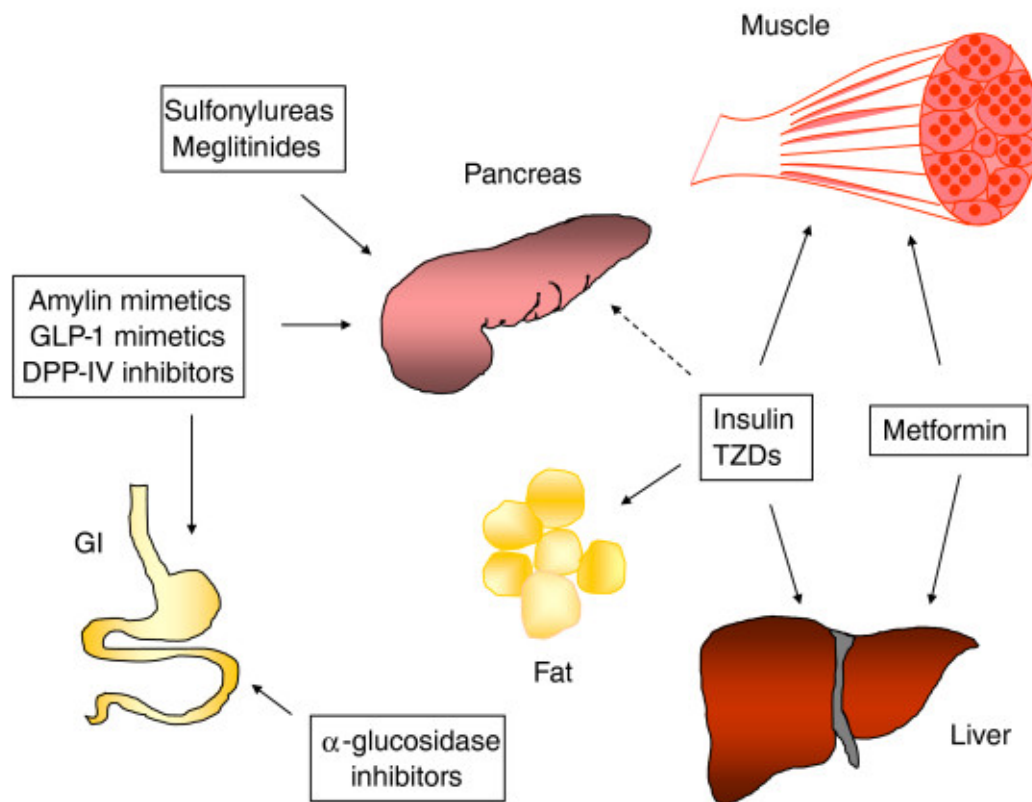


Figure 7: Les principales classes pharmacologiques utilisées pour le traitement du diabète et leurs tissus cibles (tirée de (Huang and Florez 2011)).

#### 1.2.5.2.1. Les insulinosécrétagogues

##### 1.2.5.2.1.1. Les sulphonylurés

Ils ont un effet direct sur les cellules  $\beta$  du pancréas sécrétant l'insuline. Ces médicaments se lient à des récepteurs membranaires (Sulfonylurea receptor : SUR-1) qui font partie de la famille des ATPase. Une fois les sulfonylurés liés aux récepteurs SUR-1, les canaux potassiques ( $K_{ATP}$ ) se ferment ce qui entraîne une dépolarisation membranaire. Cette dépolarisation favorise l'ouverture des canaux calciques voltage-dépendants et l'entrée du calcium dans la cellule. L'augmentation de la concentration intracellulaire du calcium active la fusion des granules contenant l'insuline avec la membrane cytoplasmique et sa libération dans le sang (Ducobu 2003; Krentz and Bailey 2005) (Figure 8).

L'hypoglycémie est un des effets indésirables le plus courant des sulphonylurés. (Krentz, Ferner et al. 1994). Les patients traités avec ces médicaments peuvent développer des réactions d'hypersensibilité surtout cutanées mais rarement. Les sulphonylurés peuvent engendrer une augmentation de poids due à l'augmentation de la concentration plasmique d'insuline et ses effets anaboliques (Krentz and Bailey 2005).

#### *1.2.5.2.1.2. Les glitinides*

Ils agissent en se liant aux récepteurs SUR-1 de la membrane cytoplasmique des cellules  $\beta$  du pancréas mais sur un site différent que celui des sulphonylurés (Figure 8). Ils stimulent rapidement la sécrétion d'insuline et doivent être pris immédiatement avant le repas pour améliorer le contrôle de la glycémie postprandiale. Les glitinides comprennent la meglitinide et ses dérivés : repaglinide et nateglinide. Ils peuvent être utilisés en monothérapie ou bien en combinaison avec la metformine ou les thiazolidinediones.

Le risque d'hypoglycémie est inférieur chez les personnes traitées avec les glitinides que les sulphonylurés. Quelques réactions d'hypersensibilité rares et un gain de poids léger peuvent être observés chez les patients consommant les glitinides (Krentz and Bailey 2005).



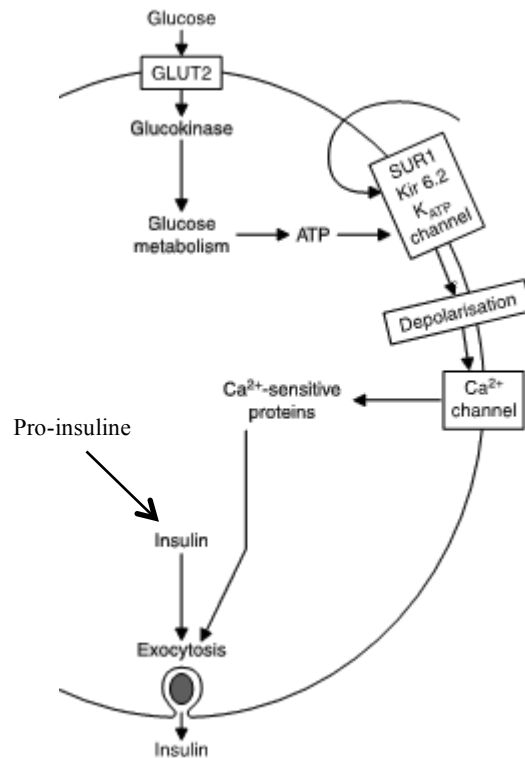


Figure 8 : Mode d'action des insulinosécrétagogues (adaptée et modifiée à partir de (Krentz and Bailey 2005)).

#### 1.2.5.2.2. Les insulino-sensibilisateurs

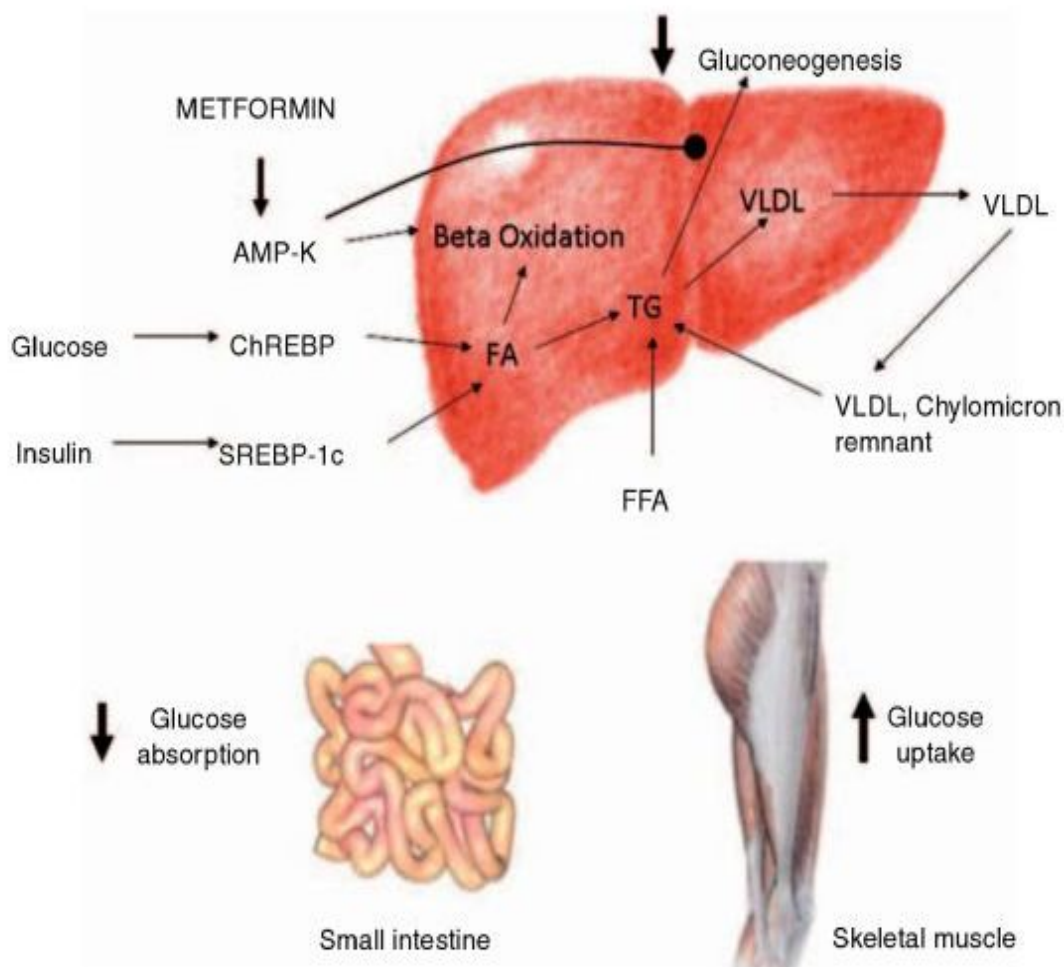
##### 1.2.5.2.2.1. Les biguanides

La metformine est le seul biguanide présent sur le marché après le retrait du phenformin en 1975; ce dernier a causé une augmentation de l'acidose lactique (Bailey and Turner 1996). Ce médicament agit en produisant plusieurs effets métaboliques mais les mécanismes d'action au niveau cellulaire ne sont pas complètement connus. Il a été démontré que l'AMPK est la cible intracellulaire possible de la metformine (Zhou, Myers et al. 2001). Cette kinase agit en phosphorylant plusieurs autres protéines pour contrôler le métabolisme du glucose et des lipides ainsi que l'homéostasie énergétique (Winder and Hardie 1999). Le mécanisme d'action prédominant de la metformine dans la baisse de glycémie est la diminution de la production hépatique de glucose en améliorant la sensibilité à l'insuline et en diminuant la disponibilité de

certaines substrats de la néoglucogenèse (comme le lactate). La metformine diminue aussi la glycogénolyse. Au niveau des muscles, la metformine stimule le transport de glucose insulino-dépendant en augmentant la translocation des GLUT4 vers la membrane cytoplasmique et entraîne l'activation de l'enzyme Glycogène synthétase ce qui augmente la synthèse de glycogène (Figure 9).

La metformine agit aussi par un mécanisme insulino-indépendant pour activer l'oxydation des acides gras et diminuer le taux de triglycérides chez les patients souffrant d'hypertriglycéridémie.

La metformine est le premier choix de traitement pour les personnes obèses souffrant du diabète de type 2. Il peut être combiné avec un hypoglycémiant oral d'une autre classe ou l'insuline. Son utilisation est contre-indiquée chez les personnes avec insuffisance rénale par précaution contre l'accumulation du médicament (Krentz and Bailey 2005).



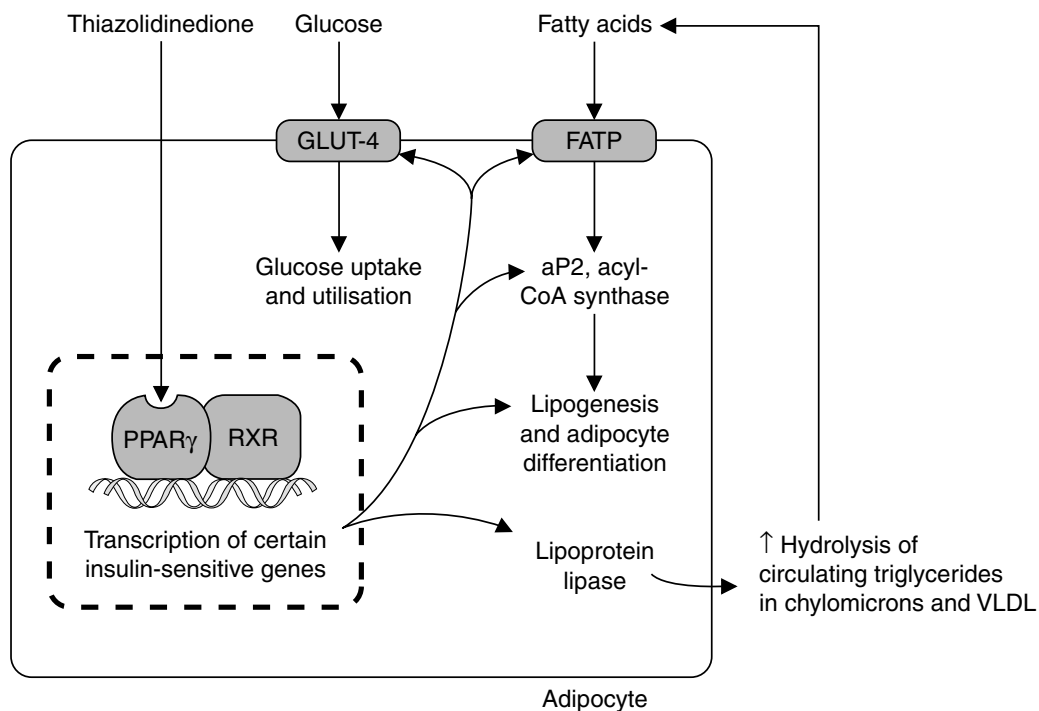
Source: Ther Adv Gastroenterol © 2011 SAGE Publications Ltd

Figure 9: Mécanisme d'action de la metformine (tirée de (Van Wagner and Rinella 2011)).

#### 1.2.5.2.2. Les thiazolidinediones (TZDs)

Ce sont des agonistes synthétiques du PPAR $\gamma$  qui est un récepteur nucléaire exprimé fortement dans le tissu adipeux. Troglitazone, le premier médicament de cette classe, a été retiré du marché en 2000 suite à l'apparition de plusieurs cas d'hépatotoxicité fatale contrairement aux deux autres TZDs, rosiglitazone et pioglitazone, qui n'ont pas montré cet effet (Krentz, Bailey et al. 2000). Cependant la rosiglitazone a été retirée du marché européen en 2010 suite à

Les TZDs améliorent la sensibilité à l'insuline par plusieurs mécanismes. Le plus important semble être la stimulation du PPAR $\gamma$ . Une fois activé, le PPAR $\gamma$  s'associe à un autre récepteur (Retinoid X receptor : RXR) pour former un hétérodimère qui va moduler la transcription de plusieurs gènes impliqués dans le métabolisme des hydrates de carbone et des lipides (Rosen and Spiegelman 2001). La stimulation du PPAR $\gamma$  par les TZDs favorise la différenciation des pré-adipocytes en adipocytes accompagnée de lipogenèse, stockage des graisses et diminution du taux d'acides gras libres. Ceci améliore l'effet et la sensibilité à l'insuline. En plus, les TZDs inhibent la sécrétion des cytokines pro-inflammatoires comme le TNF- $\alpha$  et augmentent le taux d'adiponectine (Yki-Jarvinen 2004). Les TZDs augmentent aussi le transport de glucose dans les muscles (Krentz and Bailey 2005) (Figure 10).



42

#### *1.2.5.2.3. Les inhibiteurs de l' $\alpha$ -glucosidase*

Les médicaments de cette classe comme l'acarbose et le Miglitol sont des inhibiteurs de l'enzyme  $\alpha$ -glucosidase responsable du clivage des disaccharides et oligosaccharides en monosaccharides qui seront par la suite absorbés par les cellules intestinales. Cette inhibition diminue la quantité de glucose absorbée par l'intestin et aide à diminuer les concentrations d'insuline postprandiales. Ces médicaments doivent être administrés avec des repas contenant des carbohydrates digestibles et non pas des monosaccharides vue qu'ils n'affectent pas l'absorption de glucose.

Quelques problèmes d'intolérance gastro-intestinale sont considérés comme des effets indésirables de ces agents hypoglycémiants et limitent considérablement leur utilisation (Krentz and Bailey 2005).

#### *1.2.5.2.4. Les incrétines et les inhibiteurs de dipeptidyl peptidase-4 (DPP-4)*

Les incrétines sont des hormones gastrointestinales qui stimulent la sécrétion de l'insuline par les cellules pancréatiques et inhibent la sécrétion de glucagon (Figure 11). Les deux plus importantes sont les Glucagon-like peptide-1 (GLP-1) et les Glucose-dependant Insulinotropic Polypeptide (GIP). Les incrétines sont dégradées rapidement en forme inactive par l'enzyme DPP-4 (Verspohl 2009). La nouvelle classe de médicaments anti-diabétiques comportent des analogues synthétiques de GLP-1 résistants à l'effet de la DDP-4 comme l'exenatide et liraglutide ainsi que des inhibiteurs de l'enzyme DPP-4 comme sitagliptin et vildagliptin (Halimi 2008).

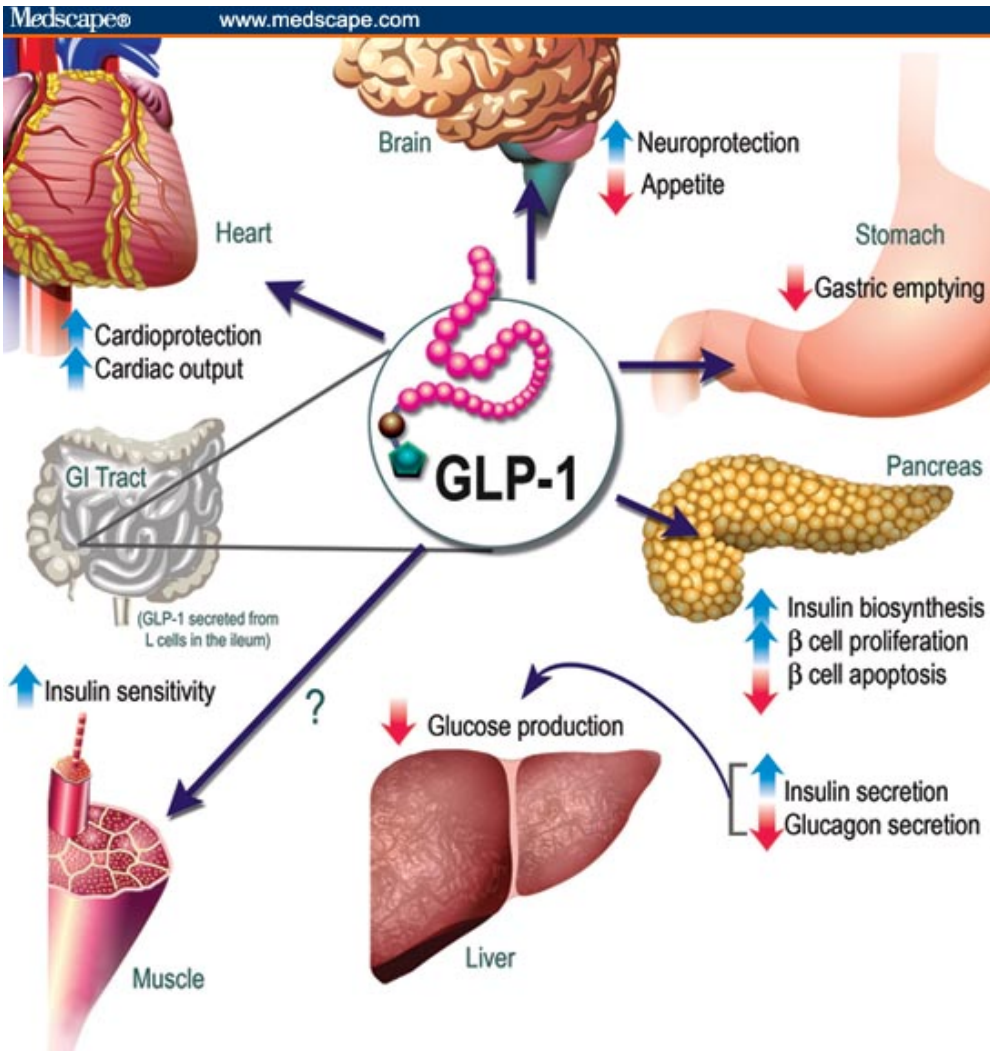


Figure 11: GLP-1 et ses effets sur le métabolisme (tirée de (Pratley 2008)).

#### 1.2.5.2.5. Les inhibiteurs de SGLT2

Une nouvelle classe de médicaments anti-diabétiques a récemment été découverte pour être utilisée seule ou en combinaison avec d'autres HGO dans le but de bien contrôler la glycémie. Elle comprend les inhibiteurs des transporteurs sodium-glucose de type 2 (SGLT2). Ces agents inhibent la réabsorption du glucose dans les tubules rénaux et cela aboutit à une élimination accrue de cette molécule par les reins et par la suite à une diminution de la glycémie. Il a été démontré que les inhibiteurs des SGLT2 améliorent le contrôle de la glycémie comparablement à d'autres HGO simultanément avec une diminution du poids, de la

pression artérielle et du taux de cholestérol. Un médicament de cette classe, canagliflozin, a été récemment approuvé par la FDA (US Food and Drug Administration) alors que 2 autres, dapagliflozin et empagliflozin, sont actuellement en phase clinique (Rosenwasser, Sultan et al. 2013).

#### *1.2.5.2.6. L'insuline*

Bien que plusieurs classes de médicaments antidiabétiques soient présentes sur le marché, quelques patients auront recours aussi à des injections d'insuline. En effet, si le traitement par un seul HGO ou une combinaison de deux ou plus montre une incapacité dans le contrôle de la glycémie ceci reflète une impuissance au niveau des cellules  $\beta$  du pancréas et nécessite le recours à l'insulinothérapie (Krentz and Bailey 2005). Le traitement à l'insuline pourra être utilisé en monothérapie ou bien en combinaison avec d'autres agents hypoglycémifiants afin de bien contrôler la glycémie (Ambavane, Patil et al. 2002; Krentz and Bailey 2005).

### **1.2.5.3. La médecine alternative et les produits de santé naturels**

Malgré le développement de plusieurs médicaments antidiabétiques dans le monde, le contrôle de la glycémie n'est pas tout à fait réalisé et satisfaisant. Plusieurs personnes ont recours à des produits de santé naturels seuls ou en combinaison avec leurs hypoglycémifiants oraux. Plus d'un tiers de la population canadienne souffrant du diabète utilisent la médecine alternative complémentaire (McFarland, Bigelow et al. 2002; Nahas and Moher 2009).

L'utilisation des produits de santé naturels dans le monde a commencé depuis des centaines, voir des milliers, d'années et cela dans la médecine traditionnelle de plusieurs populations comme celles de la Chine, de l'Inde, du Mexique et de la Grèce. Des études réalisées en laboratoire avec des équipes de recherche ont montré que plusieurs produits de santé naturels contiennent des composés actifs très avantageux dans le traitement de certaines maladies comme le diabète et l'obésité. Un exemple très courant est la metformine, l'hypoglycémifiant oral le plus utilisé au monde, qui est un dérivé d'un composé naturel, la guanidine. La

guanidine a été isolée à partir de *Galega officinalis*, connu sous le nom de Lilas Français (*French Lilac*) (Yeh, Eisenberg et al. 2003).

Plusieurs études ont effectué une synthèse de l'utilisation des produits de santé naturels dans le monde par différentes populations afin de contrôler la glycémie et de traiter le diabète. Parmi ces produits on peut citer *Coccinia indica* (courge écarlate), *Ocimum sanctum* (basilic sacré) et *Gymnema sylvestre* utilisés par Ayurveda, une des plus importantes médecines traditionnelles indiennes. *Bauhinia forficata* et *Myrcia uniflora* sont deux autres produits utilisés par des populations de l'Amérique du Sud afin de traiter le diabète (Yeh, Eisenberg et al. 2003). *Trigonella foenum gracum* (fenugrec) est un produit largement utilisé en médecine alternative en Afrique du Nord, en Inde et au Moyen-Orient (Haddad, Depot et al. 2001). *Panax ginseng* C.A. Meyer (ginseng asiatique) et *Panax quinquefolium* (ginseng américain) sont deux espèces importantes du ginseng, une base de la pharmacopée asiatique, connus pour leur effet bénéfique sur le contrôle de la glycémie chez les patients diabétiques (Vuksan, Sung et al. 2008; De Souza, Jenkins et al. 2011; Mucalo, Rahelic et al. 2012). D'autres produits aussi comme *figus carica* (feuille de vigne) utilisé en Espagne et le Sud-Ouest de l'Europe, *Opuntia streptacantha* utilisé par des populations mexicaines et *Momordica charantia* connu sous le nom de poire balsamique utilisé en Inde, Asie, Amérique du Sud et en Afrique sont utilisés afin de contrôler la glycémie et de traiter le diabète (Yeh, Eisenberg et al. 2003).

### **1.3. La pharmacopée traditionnelle Crie de la Baie James**

La population canadienne autochtone présente un risque plus élevé pour développer le diabète de type 2 que le reste de la population canadienne en général. Ceci est dû à une prédisposition génétique et des changements rapides dans leurs habitudes de vie (Ekoe, Thouez et al. 1990). La prévalence du diabète de type 2 est de 3 à 5 fois plus élevée chez les communautés Cris de la région de la Baie James du Nord-Est du Canada que la population québécoise en général. Ces populations souffrent aussi d'une fréquence plus élevée dans l'apparition des complications reliées au diabète de type 2 (Hanley, Harris et al. 2005). Tout ceci est relié à plusieurs facteurs mais surtout à leur non adhérence aux thérapies pharmaceutiques modernes (Thouez, Ekoe et al. 1990).



En 2003 notre équipe de recherche a entamé un projet visant à tester l'effet anti-diabétique des plantes médicinales utilisées par les communautés Cris de la région de la Baie James du Nord du Québec dans les tissus cibles comme le muscle, le foie et le tissu adipeux ainsi qu'à isoler les principes actifs responsables de cet effet et élucider leurs mécanismes d'action. Suite à des enquêtes ethnobotaniques, 17 plantes prometteuses ont été identifiées (Leduc, Coonishish et al. 2006; Fraser, Cuerrier et al. 2007). Ces plantes ont été testées dans le muscle et le tissu adipeux pour évaluer leur effet sur le transport de glucose et l'adipogenèse (Spor, Martineau et al. 2006; Harbilas, Martineau et al. 2009). D'autres études ont été subséquemment réalisées afin d'étudier les mécanismes d'action en évaluant l'effet des plantes sur les voies de signalisation (Eid, Martineau et al. 2010; Martineau, Herve et al. 2010; Martineau, Muhammad et al. 2010; Nistor Baldea, Martineau et al. 2010). Par la suite, certaines de ces plantes, identifiées comme étant les plus prometteuses par leur effet anti-diabétique ou anti-obésité, ont été évaluées dans des études *in vivo* afin de valider leur action dans des modèles de souris obèses et insulino-résistantes (Harbilas, Brault et al. 2012; Harbilas, Vallerand et al. 2012; Harbilas, Vallerand et al. 2013).

#### **1.4. Le bleuet nain du genre *Vaccinium***

Les bleuets sont les fruits des plantes à fleurs du genre *Vaccinium*, section *cyanococcus*. Ils sont connus par leur richesse en nutriments, vitamines et composés antioxydants. Le bleuet sauvage ou *lowbush*, *Vaccinium angustifolium* Ait., se trouve en abondance au Québec, notamment dans la même forêt boréale d'où proviennent les plantes de la pharmacopée traditionnelle Crie.

Le profil phytochimique du bleuet montre qu'il est riche en composés bioactifs; les plus abondants étant les flavonoides, les pro-anthocyanidines, les ellagitannins, les stilbenoides, les acides phénoliques et les lignanes (Manach, Scalbert et al. 2004; Harris, Burt et al. 2007; Seeram 2008).

En se basant sur une enquête ethnobotanique réalisée auprès des tradipraticiens (herboristes, naturopathes et autres) au Canada (Haddad, Depot et al. 2001) ainsi que les données présentes dans la littérature, notre laboratoire s'est intéressé à l'étude du bleuet sauvage, notamment à

évaluer son effet anti-diabétique. Une étude récente effectuée dans notre laboratoire sur une lignée cellulaire musculaire et des adipocytes en culture a montré que plusieurs parties de la plante *V. angustifolium* possèdent des effets anti-diabétiques importants (Martineau, Couture et al. 2006).

Récemment plusieurs études réalisées dans différentes lignées cellulaires et modèles animaux ont montré que le bleuet et en particulier le jus de bleuet possède des effets bénéfiques sur le métabolisme. Le jus de bleuet est riche en anthocyanines et flavonoïdes (composantes discutées plus en détail dans la prochaine section) et possède une activité anti-oxydante importante. Des études ont montré que la consommation de jus de bleuet peut améliorer les troubles de la mémoire chez les adultes (Krikorian, Shidler et al. 2010). De même, il possède un effet de neuroprotection dans un modèle de rétinopathie chez des rats (Tremblay, Waterhouse et al. 2012). D'autres études ont montré que le jus de bleuet possède des propriétés de vasorelaxation et pourrait être utile pour la prévention et le traitement de l'hypertension (Horrigan, Holohan et al. 2012).

La biotransformation par fermentation est une méthode largement utilisée dans l'industrie afin de changer la structure de certains composés et obtenir des produits dérivés qui possèdent parfois des activités accrues et différentes du produit initial. Il a été démontré que la biotransformation du jus de bleuet (*V. angustifolium*) par une bactérie nommée *Serratia vaccinii*, présente sur la peau des fruits, augmentait la teneur du jus en composés phénoliques ainsi que son activité anti-oxydante (Martin 2005). Ainsi, notre équipe s'est intéressée à l'effet du jus de bleuet biotransformé, notamment en comparaison avec celui du jus de bleuet normal. Une étude récente a montré que le jus de bleuet biotransformé peut induire une stimulation du transport de glucose dans les cellules musculaires et les adipocytes en culture et activer la voie de l'AMPK (Vuong, Martineau et al. 2007). Par la suite, l'effet anti-diabétique et anti-obésité du jus de bleuet biotransformé a été validé *in vivo* sur un modèle animal de souris KKA(y) (Vuong, Benhaddou-Andaloussi et al. 2009). L'étude la plus récente a montré que le jus de bleuet possède un effet protecteur sur les neurones et pourrait être utilisé pour trouver de nouveaux traitements contre les maladies neurodégénératives (Vuong, Matar et al. 2010).



Figure 12 : Bleuet nain sauvage (lowbush blueberry), *Vaccinium angustifolium*. Ait.

### 1.4.1. Composition phytochimique du bleuet

Le profil phytochimique du bleuet a servi à identifier ses composés bioactifs. Les plus abondants sont les flavonoïdes, les pro-anthocyanidines, les ellagitannins, les stilbénosides et les acides phénoliques (Manach, Scalbert et al. 2004; Harris, Burt et al. 2007; Seeram 2008).

#### 1.4.1.1 Les flavonoïdes

Les flavonoïdes sont des métabolites secondaires des plantes qui forment une sous classe des polyphénols. Plus de 6000 composés ont été identifiés à partir des plantes. Ils possèdent des propriétés anti-oxydantes importantes (Pietta 2000).

##### 1.4.1.1.1. Les anthocyanines

Les anthocyanines sont les pigments qui donnent la couleur rouge, bleue et violette aux plantes, fruits et légumes (Wu, Beecher et al. 2006). Ils existent sous forme glycosidée dans les fruits et les légumes. La forme non-glycosylée des anthocyanines s'appelle les anthocyanidines. Les six anthocyanidines les plus connues sont : la cyanidine, la delphinidine, l'élargonidine, la malvidine, la pétunidine, et la péonidine. Parmi ces six anthocyanidines,

seule l'élargonidine n'a pas été identifiée dans le bleuet sauvage (Nicoue, Savard et al. 2007). Il a été démontré que les anthocyanines contenus dans le bleuet nain sauvage, *V. angustifolium*, ont un effet anti-diabétique important dans un modèle de souris diabétiques (Grace, Ribnicky et al. 2009).

#### *1.4.1.1.2. Les flavonols et les flavanols*

Les flavonols sont des flavonoïdes qui existent sous forme de glycosides et sont abondants dans la nourriture. La quercétine, le Kaempférol et la myricétine sont les flavonols les plus abondants dans le bleuet (Hakkinen, Karenlampi et al. 1999).

Les flavanols comportent les catéchines et leurs polymères (les proanthocyanidines). La catéchine et l'épicatéchine sont les flavanols les plus retrouvés dans le bleuet (Prior, Lazarus et al. 2001; Harris, Burt et al. 2007).

#### *1.4.1.2. Les tannins*

Les tannins sont des polyphénols présents dans plusieurs plantes qui se divisent en deux classes : les tannins hydrolysables et les tannins nonhydrolysables ou condensés (Haslam 1988).

##### *1.4.1.2.1. Les tannins hydrolysables*

Les tannins hydrolysables comportent les Ellagitannins (ETs) et les Gallotannins (GTs). Ce sont des esters de l'acide gallique (GTs) ou de l'acide hexahydroxydiphénique (ETs) (Chung, Wong et al. 1998). Les tannins hydrolysables n'ont pas encore été identifiés dans le bleuet mais étant donné que la biotransformation du jus de bleuet par la bactérie *S.vaccinii* produit une grande quantité d'acide gallique, il est probable que des GTs se trouvent dans le bleuet (Martin 2005).

##### *1.4.1.2.2. Les tannins condensés (Pro-anthocyanidines)*

Les tannins condensés sont des polymères des flavanols et s'appellent les pro-anthocyanidines (Chung, Wong et al. 1998). Ce sont des oligomères et des polymères de la catéchine qui se

lient par des liaisons entre le C4 et le C8(Duenas, Sun et al. 2003). Le bleuet contient une quantité importante de pro-anthocyanidines (Gu, Kelm et al. 2002).

#### *1.4.1.3. Les acides phénoliques*

Les acides phénoliques sont des dérivés de l'acide hydroxybenzoïque et de l'acide hydroxycinnamique. Le bleuet contient une grande quantité d'acides phénoliques. Parmi les dérivés d'acides hydroxycinnamiques on peut retrouver essentiellement les acides chlorogénique, quinique, cafféique, férulique, p-, o-, et m-coumarique. Parmi les acides hydroxybenzoïques on trouve les acides gallique, vanillique, syringique, protocatéchique, ellagique, m- et p-hydroxybenzoïque (Zheng and Wang 2003; Zadernowski, Naczek et al. 2005).

#### *1.4.1.4. Les stilbénoides*

Ce groupe de composés phénoliques se trouve en grande quantité dans le vin rouge et les raisins. Son composé le plus connu, le resvératrol, a été retrouvé chez les plantes du genre *Vaccinium*, incluant le bleuet (Rimando, Kalt et al. 2004). Le resvératrol possède un effet de cardioprotection (Das and Maulik 2006). Des études récentes ont montré aussi que le resvératrol possède des effets antidiabétiques (Su, Hung et al. 2006; Chi, Chen et al. 2007; Breen, Sanli et al. 2008).

## **1.5. Hypothèses et objectifs de l'étude**

Cette étude vise à évaluer l'effet antidiabétique de certaines plantes de la forêt boréale et à identifier les principes actifs responsables de cet effet. Elle comprend deux parties. La première met en relief certaines plantes médicinales utilisées dans la médecine traditionnelle des communautés Cries de la région de la Baie James du Nord du Canada. La deuxième partie se concentre sur le jus de bleuet et surtout le jus de bleuet biotransformé.

Suite aux études précédentes réalisées avec les 17 plantes qui ont été identifiées par une enquête ethnobotanique (Leduc, Coonishish et al. 2006), il a été démontré que certaines plantes possèdent un effet anti-diabétique important en stimulant le transport de glucose dans

des lignées cellulaires musculaires et dans les adipocytes (Harbilas, Martineau et al. 2009) ainsi qu'en diminuant l'absorption intestinale de glucose dans des entérocytes (Nistor Baldea, Martineau et al. 2010). Étant donné que le foie est un organe important impliqué dans la production et le stockage de glucose, le but de ce projet est d'évaluer l'effet des 17 plantes sur l'homéostasie hépatique de glucose. Ceci sera effectué en étudiant l'effet des extraits de plantes sur des enzymes clefs de la néoglucogenèse et de la glycogénogenèse ainsi que les principales voies de signalisation impliquées. Deux lignées cellulaires hépatiques seront utilisées, H4IIE (hépatome de rat) et HepG2 (hépatome humain). Les hépatocytes H4IIE seront utilisées pour étudier l'effet des plantes sur l'activité de la G6Pase. Les hépatocytes HepG2 seront utilisés pour explorer l'activité de la GS étant donné qu'ils expriment mieux cette enzyme que les H4IIE. Par la suite, un fractionnement guidé par les bioessais sera réalisé pour la ou les plantes prometteuses afin d'isoler des composés actifs qui pourront être responsables de l'effet des extraits bruts. Ces composés actifs seront aussi évalués pour déterminer leur action sur les enzymes clefs et les voies de signalisation.

La deuxième partie de l'étude sera concentrée sur le jus de bleuet biotransformé. Les études précédentes ont montré l'effet du jus de bleuet biotransformé sur le transport de glucose dans des cellules musculaires et des adipocytes; ces effets anti-diabétique et anti-obésité ayant été validés dans un modèle animal de souris KKA(y) (Vuong, Martineau et al. 2007; Vuong, Benhaddou-Andaloussi et al. 2009). Ainsi le but de la deuxième partie de cette thèse est de fractionner les composantes du jus de bleuet biotransformé afin d'identifier les principes actifs agissant sur l'homéostasie de glucose dans le foie et le muscle. Grâce à l'approche du fractionnement guidé par les bioessais la(les) fraction(s) la(les) plus active(e) seront identifiées. Par la suite un sous-fractionnement de la fraction la plus active permettra d'isoler un ou plusieurs principes actifs qui pourront être responsables de l'effet du jus biotransformé. Les principes actifs purs seront aussi évalués à la fin pour tester leur effet sur l'activité des enzymes clefs impliquées dans l'homéostasie hépatique de glucose ainsi que leur effet sur le transport de glucose. Les lignées cellulaires hépatiques H4IIE et HepG2 seront utilisées pour étudier l'activité des enzymes clefs de la néoglucogenèse et la glycogénogenèse. Les myocytes, C2C12, seront utilisés pour étudier l'effet des composés sur le transport de glucose

étant donné qu'ils se différencient facilement en myotubes et qu'ils expriment les transporteurs de glucose GLUT4.

## **Chapitre 2. Article 1**

# **The action of antidiabetic plants of the Canadian James Bay Cree traditional pharmacopeia on key enzymes of hepatic glucose homeostasis**

### **Auteurs**

Abir Nachar <sup>1,2</sup>, Diane Vallerand <sup>1,2</sup>, Lina Musallam <sup>1,2</sup>, Louis Lavoie <sup>1,2</sup>, Alaa Badawi<sup>3</sup>, John Arnason<sup>4</sup>, Pierre S. Haddad <sup>1,2</sup>

### **Affiliations**

<sup>1</sup> Natural Health Products and Metabolic Diseases Laboratory, Department of Pharmacology, Université de Montréal, Montreal, QC, Canada

<sup>2</sup> Canadian Institutes of Health Research Team in Aboriginal Antidiabetic Medicines and Montreal Diabetes Research Center, Canada

<sup>3</sup> Office of Biotechnology Genomics and population health, Toronto, ON, Canada

<sup>4</sup> Department of biology, University of Ottawa, Ottawa, ON, Canada

Cet article a été publié en juillet 2013 dans le journal Evidence-based Complementary and Alternative Medicine (ECAM): Nachar et al. Evid. Based Compl. Alt Med. 2013;2013:189819).



## **Contribution de chaque co-auteur**

J'ai effectué tous les travaux expérimentaux, l'analyse des données ainsi que la rédaction de l'article.

Diane Vallerand a contribué dans la réalisation des expériences de western blot.

Lina Musallam et Louis Lavoie étaient des coordonnateurs de recherche dans le laboratoire qui suivaient les étudiants et élaboraient des suggestions.

Alaa Badawi fait partie de l'organisme qui subventionne le projet.

Dr John Arnason est notre collaborateur dont le laboratoire nous prépare les extraits de plante.

Dr Pierre S. Haddad est mon directeur de recherche qui m'a supervisé tout le long de ma période d'études. Il a initié le cadre conceptuel du projet, aidé dans l'interprétation des données et corrigé l'article.

## Abstract

We determined the capacity of putative antidiabetic plants used by the Eastern James Bay Cree (Canada) to modulate key enzymes of gluconeogenesis and glycogen synthesis and key regulating kinases.

Glucose-6-phosphatase (G6Pase) and glycogen synthase (GS) activities were assessed in cultured hepatocytes treated with crude extracts of seventeen plant species. Phosphorylation of AMP-dependent protein kinase (AMPK), Akt and Glycogen synthase kinase-3 (GSK-3) were probed by Western blot.

Seven of the seventeen plant extracts significantly decreased G6Pase activity; *Abies balsamea* and *Picea glauca*, exerting an effect similar to insulin. This action involved both Akt and AMPK phosphorylation. On the other hand, several plant extracts activated GS; *Larix laricina* and *A. balsamea* far exceeding the action of insulin. We also found a significant correlation between GS stimulation and GSK-3 phosphorylation induced by plant extract treatments.

In summary, three Cree plants stand out for marked effects on hepatic glucose homeostasis. *P. glauca* affects glucose production whereas *L. laricina* rather acts on glucose storage. However, *A. balsamea* has the most promising profile, simultaneously and powerfully reducing G6Pase and stimulating GS. Our studies thus confirm that the reduction of hepatic glucose production likely contributes to the therapeutic potential of several antidiabetic Cree traditional medicines.

**Keywords:** type 2 diabetes, insulin resistance, Aboriginal traditional medicine, medicinal plants, Glucose-6-phosphatase, glycogen synthase, Akt, AMPK, GSK-3.

## ***1-Introduction***

Diabetes is a chronic disease that occurs in two forms, namely Type 1 and Type 2 diabetes. Type 1 diabetes affects mostly young people and is due to an autoimmune destruction of islet cells which secrete insulin(Efrat 2008). Type 2 diabetes is characterized by decreased insulin sensitivity in major target organs such as liver, muscle and adipose tissues, in addition to a decreased insulin secretion by the beta pancreatic cells(Cheng, Iglesias et al. 2009).

These defects in patients with Type 2 diabetes cause an increase in fasting and postprandial glucose, which increases the risk of microvascular (e.g. Retinopathy, neuropathy and nephropathy) and macrovascular (mainly stroke and peripheral vascular dysfunction) complications of diabetes(Edelman, Garg et al. 2007).

Approximately 370 million people in the world are affected by diabetes. In Canada more than 9 million people are diabetic or prediabetic. The risk to develop Type 2 diabetes in aboriginal population is three to five times higher than the general Canadian population(<http://www.diabetes.ca/diabetes-and-you/what/prevalence/> ; Ekoe, Thouez et al. 1990). Since 2003, our team has been examining the antidiabetic potential of selected plants used in the traditional medicine of several Cree communities in the James Bay region of Northeastern Canada. Previous studies from our group have concentrated on a group of 17 promising plant species identified through ethnobotanical surveys(Leduc, Coonishish et al. 2006; Fraser, Cuerrier et al. 2007). These plants have notably been screened in bioassays of skeletal muscle and adipose tissue to identify the plants' potential to improve glycemic control (Spoor, Martineau et al. 2006; Harbilas, Martineau et al. 2009). In continuity with these studies, the aim of this project is to evaluate the effect of these seventeen medicinal plants on hepatic glucose homeostasis.

Glucose homeostasis is the result of a balance between glucose production by the liver (gluconeogenesis), its storage as glycogen (liver and muscle) and its uptake by peripheral tissues, notably insulin-responsive skeletal muscle and adipose tissue. Indeed, insulin, a hormone secreted by the beta pancreatic cells, works by decreasing glucose production in the liver, stimulating its uptake by skeletal muscle and peripheral tissues, and enhancing its storage as glycogen(Saltiel 1996). Therefore, in Type 2 diabetes, beta pancreatic cell insulin deficiency is combined with insulin resistance, thus contributing to a state of hyperglycemia

through an increased hepatic glucose production and a reduced peripheral glucose disposition (Gonzalez, Beruto et al. 2006).

Gluconeogenesis is the major metabolic pathway through which the liver produces glucose from precursors such as amino acids, lactate, glycerol and pyruvate. This process includes several linked enzymatic reactions and is mainly activated after a fast and in diabetic patients (Watford 2005). Hepatic gluconeogenesis is controlled at three major points, namely the reactions catalyzed by phosphoenolpyruvate carboxykinase (PEPCK), by fructose-1,6-biphosphatase and by glucose-6-phosphatase (G6Pase). Insulin normally reduces the activity of these enzymes to help normalize blood glucose. It does so through the activation of the signaling kinase Akt and the subsequent phosphorylation of transcription factors controlling the expression of PEPCK and G6Pase. The phosphorylated transcription factors are then expelled from the nucleus, the expression of enzymes is inhibited and the production of glucose in the liver is eventually reduced (Herzig, Long et al. 2001; Puigserver, Rhee et al. 2003). In diabetic patients, hepatic insulin resistance interferes with these events, resulting in an increased hepatic glucose, a major contributor to fasting hyperglycemia (Rosella, Zajac et al. 1993; Mues, Zhou et al. 2009). G6Pase is an endoplasmic reticulum enzyme responsible of the final release of glucose into the circulation (Gonzalez-Mujica, Motta et al. 2005) and is considered to represent the rate-limiting step of gluconeogenesis (Schmoll, Walker et al. 2000). Moreover, an inactivating mutation in the gene of this enzyme leads to hypoglycemia but an increase in its expression is followed by hyperglycemia and the onset of diabetes (Hutton and O'Brien 2009). We have thus selected a G6Pase assay to probe the Cree plants for additional antidiabetic potential targeting the liver.

On the other hand, glycogen synthase (GS) catalyzes the rate limiting step of glycogenogenesis and is thus responsible for the storage of glucose as in both the liver and skeletal muscle. This enzyme is regulated by several transcriptional factors and kinases, the most important one being glycogen synthase kinase-3 (GSK-3). GSK-3 is a serine/threonine kinase implicated in many diseases such as diabetes, cancer, inflammation and Alzheimer (Martinez, Castro et al. 2002). GSK-3 phosphorylates and inhibits GS thereby decreasing glycogen synthesis in liver and muscles (Wang and Roach 1993). Insulin phosphorylates and inactivates GSK-3, thus leading to the activation of the GS and the storage of glucose as glycogen (Cross, Alessi et al. 1994; Grimes and Jope 2001). Therefore, we have

also chosen to measure GS activity to determine the action of putative antidiabetic Cree plants on hepatic glucose homeostasis.

Aside from the hormonal regulation involving insulin, hepatic glucose homeostasis is also regulated by factors implicated in the control of energetic balance. A key kinase in this context is called AMP-activated protein kinase (AMPK), which is activated after metabolic stress (increase of the ratio AMP/ATP in the cell)(Towler and Hardie 2007). Once phosphorylated, active AMPK inhibits anabolic pathways (decrease of the fatty acids synthesis, decrease of the gluconeogenesis and increase of the storage of glucose as glycogen) and simultaneously increases catabolic pathways (increase of muscle glucose uptake, increase of the fatty acid oxidation and increase of the glycolysis). Moreover, AMPK is activated by metformin, one of the most common oral hypoglycemic drugs used worldwide for glycemic control in diabetes and metabolic syndromes (Viollet, Mounier et al. 2007). We therefore probed liver cell cultures for a potential action of Cree plants on AMPK, in relation to their effects on liver glucose metabolic enzymes.

The present study thus reports the effect of seventeen plants used in the traditional pharmacopeia of the Eastern James Bay Cree of Northern Quebec (Canada) on the activity of key enzymes of gluconeogenesis and glycogen synthesis as well as key kinases regulating these enzymes.

## ***2-Material and methods***

### ***2.1-Cell culture***

The cell lines H4IIE (rat hepatoma) and HepG2 (human hepatoma) were provided by American Type Culture Collection (ATCC). H4IIE cells were grown in high glucose Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) supplemented with 10% Fetal Bovine Serum (FBS) and 0.5% antibiotics (PS: Penicillin 100 U/mL, Streptomycin 100 µg/mL). The HepG2 cells were grown in DMEM/F12 (50/50) medium supplemented with 10% FBS and 0.5% PS. The cells were incubated at 37°C, 5% CO<sub>2</sub> until reaching 90% confluence.

### ***2.2-Plant preparation***

As mentioned, plant species were selected on the basis of ethnobotanical surveys previously reported (Leduc, Coonishish et al. 2006; Fraser, Cuerrier et al. 2007). A taxonomist, Dr. Alain Cuerrier, identified these plants and voucher specimens have been deposited at the herbarium of the Montreal Botanical Garden. They were harvested in the Easter James Bay area in respect of Aboriginal guidelines and extracted with 80 % ethanol, as previously described (Spoor, Martineau et al. 2006; Harbilas, Martineau et al. 2009).

### ***2.3-Cytotoxicity assay (LDH)***

As was done previously for skeletal muscle and adipocyte cell lines (Spoor, Martineau et al. 2006; Harbilas, Martineau et al. 2009), maximal non-toxic concentrations of extracts were determined with the help of a cytotoxicity test, namely that of lactate dehydrogenase (LDH) release (LDH Colorimetric kit; Roche, Mannheim, Germany). After an overnight treatment (16-18 hours) with different extracts at different concentrations, the cell culture media for each condition were collected separately (representing released LDH). The cells were then lysed with culture medium containing 1% triton X-100, for 10 minutes at 37°C, 5% CO<sub>2</sub> (representing cellular LDH). All samples were collected in eppendorf tubes and centrifuged at 250xg at 4°C for 10 minutes. Results were expressed as the ratio of released LDH to total LDH (total LDH= released LDH+ cellular LDH), normalized to values obtained from cells treated with the vehicle control (0.1% DMSO) and used to determine the optimal non toxic concentration for each extract.

#### ***2.4-Hepatic glucose production***

Glucose-6-phosphatase activity was assessed in the H4IIE cell line. Briefly, cells (90% confluent in 12-well plates) were treated for 18h with negative control (0.1% DMSO vehicle), positive control (Insulin, 100nM) and seventeen plant extracts at their respective optimal non-toxic concentrations. After 18h, cells were washed then lysed in 15mM Phosphate buffer containing 0.05% triton X-100 and 1.3mM Phenol (pH = 6.5). Cell lysates were incubated in glucose-6-phosphate-containing buffer (200mM) for 40 min at 37°C where the G-6-P serves as a substrate for endogenous Glucose-6-phosphatase to yield glucose. Quantification of the glucose generated in this reaction was measured using Wako AutoKit Glucose colorimetric assay (Wako Chemicals USA Inc, Richmond, VA), according to manufacturers' instructions. Protein content was determined using the BCA method. Results are presented relative to vehicle control (0.1% DMSO).

#### ***2.5-Glycogen Synthase activity***

HepG2 cells were grown to confluency in DMEM/F12 (50/50) medium containing 10% FBS (Fetal Bovine Serum) and 0.5% PS at 37°C, 5% CO<sub>2</sub>. Cells were plated in 6-well plates for 4 days, then treated overnight (16-18h) with negative control (0.1% DMSO vehicle) or each of the seventeen plant extracts at their respective optimal concentration. Positive controls were insulin (100nM for 15 min) and 5-Aminoimidazole-4-carboxamide-1-β-D-ribofuranoside (AICAR, 2mM for 120 min). After treatment, cells were suspended in buffer solution (50 mM glycylglycine, 100 mM sodium fluoride, 20 mM EDTA, 0.5% glycogen, pH 7.4 + complete protease inhibitor cocktail). The lysates were centrifuged at 1000xg for 20 minutes at 4°C. 30 μL of supernatant were added to 100 μL of buffer solution for active GS (25 mM glycylglycine, 0.275 mM UDP-glucose, 0.12 μCi/mL U-<sup>14</sup>C UDP-glucose, 1% glycogen, 1 mM EDTA, 10 mM sodium sulfate, pH 7.5) and another 30 μL of supernatant were added to 100 μL of buffer solution for total GS (25 mM Tris, 5 mM UDP-glucose, 0.12 μCi/mL U-<sup>14</sup>C UDP-glucose, 1% glycogen, 3 mM EDTA, 5 mM glucose-6-phosphate, pH 7.9). All the tubes were incubated at 30°C for 120 minutes. After incubation 90 μL of the mix was transferred on Watman paper (Watman 31 ET chr 2 cm<sup>2</sup>). The papers were rinsed with cold ethanol (4°C) for 30 minutes than 2 times with ethanol 66% at room temperature for 30 minutes. The papers were covered with acetone for 2-3 minutes than transferred into scintillation vials. The

resulted radioactivity was counted with a specific protocol for  $^{14}\text{C}$  using a  $\beta$ -counter (LKB Wallac 1219; Perkin-Elmer, Woodbridge, ON, Canada).

## ***2.6-Western blot***

Cells were lysed in RIPA buffer (RadioImmun Precipitation Assay) (0.1 M Hepes, 0.3 M NaCl, 10 mM EGTA, 4 mM  $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , 10% glycerol, 2% Triton X-100, 0.2% SDS, 2 mM PMSF, 10 mM NaF, 100  $\mu\text{M}$  Na-orthovanadate, 1 mM Na-pyrophosphate). After centrifugation at 12000xg, 4°C, for 12 minutes, the supernatants were collected and used for western blot analysis. 40 $\mu\text{g}$  of proteins were loaded onto an electrophoresis gel then transferred on nitrocellulose membrane (Millipore, Bedford, MA). The membranes were blocked for 2 hours in TBST (20 mM Tris, pH 7.6, 137 mM NaCl, 0.1% Tween-20) + 5% milk. Antibodies used were the following: p-GSK-3 (Ser 9), GSK-3 (1:1000, 5% milk, Millipore, Bedford, MA). Secondary antibody: anti-rabbit (1:50000, 5% milk, Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, PA, USA). p-AMPK $\alpha$  (Thr 172) (1:350, 5%BSA, Cell Signaling Technology, Danvers, MA), AMPK (1:500, 5% BSA, Cell Signaling Technology, Danvers, MA). Secondary antibody: anti-rabbit (1:4000, 5% BSA, Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, PA, USA). p-Akt (Thr 308) (1:1000, 5% BSA, Cell signaling Technology, Danvers, MA), Akt (1:1000, 5% BSA, Cell Signaling Technology Danvers, MA). Secondary antibody: anti-rabbit (1:10000, 5% BSA, Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, PA, USA).

The membranes were incubated with primary antibodies overnight at 4°C then with secondary antibodies 1 hour at room temperature. Finally the bands were detected with the ECL Plus western blot detection system (Perkin Elmer, Woodbridge, Canada).

## ***2.7-Statistical analysis***

All data are reported as the mean  $\pm$  SEM of 3 different experiments with triplicate for each sample. Results were analyzed by one-way analysis of variance (ANOVA) using StatView software (SAS Institute Inc., Cary, NC). A  $p$  value below 0.05 was considered statistically significant.



### **3-Results**

#### **3.1 - LDH test (cytotoxicity)**

Hepatic cells (H4IIE and HepG2) were treated overnight (16-18h) with plant extracts at different concentrations and LDH release measured. Table 1 presents the maximal non-toxic concentrations determined for each plant extract. At the selected concentrations, none of the extracts induced more than 9% release of LDH. These concentrations were subsequently used for all experiments.

#### **3.2- Seven of the seventeen plant extracts have a potential to decrease hepatic glucose production**

We used the inhibition of rate-limiting glucose-6-phosphatase activity in H4IIE hepatocytes as a measure of the antidiabetic potential of Cree plant extracts at the level of the liver. As expected, insulin (positive control) decreased G6Pase activity by approximately 60%. Out of the seventeen plant extracts tested, eight had a statistically significant effect on G6Pase activity when compared to respective DMSO vehicle controls run in parallel (Figure 1). Seven of the eight plants reduced activity by 50 to 30% on average, whereas *Salix planifolia* increased activity by 43%. The inhibitory activity of extracts of *Picea glauca* and *Abies balsamea* were almost as important as the insulin positive control (reductions of 50% and 48%, respectively, compared to DMSO).

#### **3.3-Absence of additive effect of either *P. glauca* or *A. balsamea* extracts with insulin**

Since the effects of *P. glauca* and *A. balsamea* were in the same order of magnitude as the insulin control, we sought to examine whether the plant extracts and the hormone showed any interaction in biological activity. Figure 2 presents the results of experiments where each plant extract was administered individually with or without insulin. As can be easily appreciated, insulin did not influence the effect of each plant extract and *vice versa*.

### ***3.4-Differential modulation of insulin-dependent and –independent signaling by Cree plant extracts in H4IIE hepatocytes***

We next sought to determine if insulin-dependent and/or –independent signaling pathways were involved in the observed effects of plant extracts on G6Pase activity. H4IIE hepatocytes were thus incubated as above with each of the seventeen plant extracts and probed for phosphorylated Akt (key signaling kinase of the insulin-dependent metabolic pathway) and for phosphorylated AMPK (key metabolic switch kinase responsible for insulin-independent metabolic pathway). As shown in Figure 3 (Panel A), six of the seventeen plants significantly enhanced the phosphorylation of Akt. Two of these six, namely *A. balsamea* and *P. glauca*, were plant extracts also observed to significantly decrease G6Pase activity in H4IIE hepatocytes. However, we found no correlation between Akt phosphorylation and modulation of G6Pase activity (data not illustrated).

Unlike Akt, all but two of the seventeen plant extracts tested were found to induce a significant increase in the phosphorylation of AMPK when compared to vehicle control (Figure 3B). A number of plant extracts, notably *A. balsamea*, *Rhododendron groenlandicum*, *Larix laricina*, *Pinus banksiana*, *Picea mariana* and *Gaultheria hispidula* exerted effects that were 2-4 fold greater than the positive control AICAR. However, as with Akt, no correlation was found between the ability of a plant's extract to activate AMPK and to inhibit G6Pase (data not illustrated).

### ***3.5 - Two Cree plants stand out for very potent stimulation of glycogen synthase activity.***

Glycogen synthase (GS) is the second rate-limiting enzyme involved in hepatic glucose homeostasis that we used to probe for the antidiabetic potential of Cree plant extracts. As expected, the hormone insulin, used as a positive control activated GS by 2 fold when compared to the DMSO vehicle control in HepG2 cells (Figure 4A). AICAR, an activator of AMPK, also induced a similar 2-fold increase in GS activity. Several plants also significantly stimulated GS activity as much or greater than the insulin and AICAR controls (between 3 and 2-fold). However, two plants clearly stood out of the lot. Indeed, *A. balsamea* and *L. laricina*

activated the enzyme by 11 and 9 folds, respectively, compared to the DMSO vehicle control (figure 4A).

### ***3.6 - Implication of GSK-3 in the action of Cree plants on Glycogen Synthase.***

As expected, and compared to the DMSO vehicle control, insulin treatment lead to a significant (over 2-fold) increase in the phosphorylation of GSK-3, which is known to inactivate the kinase, hence releasing its inhibitory action on GS and favoring glucose storage as glycogen. Eight of the seventeen plant extracts tested also significantly increased GSK-3 phosphorylation (figure 4B). Consistent with the results of the GS activity assay, *L. laricina* and *A. balsamea* were among the most active species to enhance GSK-3 phosphorylation. In fact, when the ability of a given plant extract to activate GS was compared to the same plant's capacity to induce GSK-3 phosphorylation, a modest yet significant positive correlation was obtained ( $r^2=0.36$ ,  $p<0.05$ , Figure 4B inset).

#### **4-Discussion**

As mentioned in the Introduction, Canadian Aboriginals suffer from a higher incidence of Type 2 diabetes(<http://www.diabetes.ca/diabetes-and-you/what/prevalence/> ; Ekoe, Thouez et al. 1990) as well as diabetic complications, a situation that has been linked to poor treatment adherence due, in part, to the cultural inappropriateness of modern drug based approaches(Hanley, Harris et al. 2005; Garriguet 2008). To provide culturally adapted complementary and alternative treatment options for these populations, we have put together a comprehensive platform of *in vitro* (mostly cell-based) bioassays and *in vivo* animal models to rigorously assess the action of Boreal forest plants on tissues/organs involved in metabolic control (Haddad, Musallam et al. 2012). Plant species were first identified through a novel ethnobotanical survey methods based on a set of clinically relevant diabetes symptoms (Leduc, Coonishish et al. 2006). A set of seventeen plants with promising antidiabetic potential was initially screened in pancreatic, skeletal muscle, adipocyte and pre-neuronal cell lines (Spoor, Martineau et al. 2006; Harbilas, Martineau et al. 2009). We notably established that some species exhibited the potential to accelerate adipogenesis and to stimulate glucose uptake in muscle cells and adipocytes (Spoor, Martineau et al. 2006; Harbilas, Martineau et al. 2009).

Along with peripheral glucose disposition, hepatic glucose production plays a major role in the pathogenesis of the obesity-diabetes metabolic disease continuum(Hutton and O'Brien 2009). We thus sought to further assess the antidiabetic potential of the Cree plants in liver cell lines. Two key enzymes involved in hepatic glucose storage and release were selected. We also examined major metabolic control/signaling kinases that modulate these key enzymes.

Firstly, we selected G6Pase, which is a key enzyme implicated in hepatic gluconeogenesis; being the rate-limiting step for glucose release from hepatocytes(Schmoll, Walker et al. 2000). The expression of this enzyme is enhanced by several transcription factors such as forkhead transcription factor O1 (FoxO1), hepatic nuclear factor 4 (HNF4) and peroxisome proliferator-activated receptor- $\gamma$  coactivator-1 $\alpha$  (PGC-1 $\alpha$ )(Yoon, Puigserver et al. 2001; Zhang, Patil et al. 2006). Through its receptor signaling pathways, insulin controls the expression of G6Pase. It does so by inhibiting the aforementioned transcriptional factors as well as their binding to the promoter of the G6Pase gene and to that of the PEPCK gene, another key enzyme involved in the gluconeogenesis pathway (Postic, Dentin et al. 2004). The signaling kinase Akt plays a

crucial role in insulin's metabolic action in the liver and was thus also assessed in H4IIE hepatocytes to gain insights on the potential of Cree plants to modulate insulin-dependent pathways. On the other hand, AMPK is an insulin-independent serine/threonine Kinase implicated in energy balance (Towler and Hardie 2007). It is involved in hepatic metabolic homeostasis (Zang, Zuccollo et al. 2004), which includes the ability to decrease G6Pase activity through the phosphorylation of CREB (c-AMP-regulator element-binding protein) (He, Sabet et al. 2009). We thus also probed H4IIE hepatocytes for AMPK activation after treatment with plant extracts in order to assess insulin-independent pathways.

As expected, we found that an optimal supraphysiological concentration of insulin (100nM) reduced G6Pase activity in H4IIE hepatocytes to approximately half of that seen in DMSO vehicle controls. Interestingly, a number of the Cree plant species also exhibited the capacity to lower G6Pase activity. Most prominent were *P. glauca* and *A. balsamea*, whose action was equivalent to that of the insulin positive control. When the extracts of these two plants were combined with insulin, no additive effect was observed. One plausible interpretation of this result is that *P. glauca* and *A. balsamea* may act through pathways similar to insulin; these being already maximally stimulated by the supraphysiological dose of the hormone. This was confirmed for *A. balsamea*, whose extract stimulated the phosphorylation of Akt as prominently as insulin did. This was also true for *P. glauca*, albeit to a lesser extent. In fact, no correlation could be found between the plant extracts effects on G6Pase inhibition and Akt phosphorylation. In skeletal muscle cells, several Cree plants had no effect on Akt (Martineau, Adeyiwola-Spoor et al. 2010) suggesting that plant extracts may have differential effects on insulin signaling pathways in different tissues. *A. balsamea* extract also strongly stimulated the insulin-independent AMPK pathway. In fact, its action was over three-fold greater than the AICAR positive control. In contrast, *P. glauca* stimulated the AMPK pathway to a slightly greater extent than AICAR, yet decreased G6Pase activity to the same extent as *A. balsamea*. These observations combined with the clear lack of correlation between either Akt or AMPK activation and G6Pase inhibition highlights the fact that other pathways modulating G6Pase activity may be influenced by the Cree plants. Future studies will have to take this into consideration.

On the other hand, HepG2 cells were selected to study the potential action of Cree plants on the second key enzyme of hepatic glucose homeostasis, namely glycogen synthase, because

they exhibit a better expression of this enzyme (Thomas, Schlender et al. 1968). Insulin increases the activity of glycogen synthase by inhibiting the GSK-3 (phosphorylation mechanism) thus increasing the glucose storage as glycogen (Van Wauwe and Haefner 2003; Cohen and Goedert 2004). Again, we observed that several Cree Boreal forest plants exerted a positive action on glycogen synthase; a majority of which acting at least as much as the insulin positive control, which doubled GS activity over baseline (DMSO control). However, extracts of *A. balsamea* and *L. laricina* enhanced GS activity 9-11 fold over baseline (corresponding to 4-5 fold above insulin). This skewed the statistical analysis such that only these two plants appeared to have a statistically significant impact on GS activity.

We also assessed the impact of Cree plant extracts on GSK-3 phosphorylation (leading to its inactivation (Wang and Roach 1993)) since this kinase plays a central role in the control of GS activity (Cross, Alessi et al. 1994). Unlike G6Pase, we found that the phosphorylation of GSK-3 induced by respective Cree plant extracts could explain approximately 40% ( $r^2 = 0.36$ ) of their capacity to increase GS activity. This is a respectable proportion that indicates that GSK-3 might be a common target of several Boreal forest plants. However, such a result also implies that other signaling/metabolic control pathways may also be involved and additional studies will be necessary to identify these.

Our study thus clearly supports the notion that part of the therapeutic potential of several putative antidiabetic Boreal forest plants can involve the reduction of hepatic glucose output. The results more specifically highlight the favorable profile of three plants. Firstly, *P. glauca* also stood out as the most potent Cree plant capable of reducing G6Pase activity as much as a supraphysiological concentration of insulin. This action is clearly associated with the phosphorylation of the key kinases Akt and AMPK in H4IIE hepatocytes. Previous *in vitro* studies from our group demonstrated that *P. glauca* crude extract did not affect muscle glucose uptake or adipogenesis (Harbilas, Martineau et al. 2009), yet exhibited potent effects for diabetes complications (neuroprotective action) (Harris, Mo et al. 2007). The present results add an additional therapeutic potential by demonstrating the ability of *P. glauca* to reduce the activity of the enzyme limiting hepatic glucose output.

Secondly, *L. laricina* extract was found to be a potent modulator of the glycogen storage pathway. Indeed, it increased GS activity several fold more than a supraphysiological concentration of our insulin reference positive control. Likewise, the plant's capacity to

enhance GSK-3 phosphorylation was the greatest of all Cree plants and, again, more than two-fold that of insulin. Moreover, although *L. laricina* did not significantly alter G6Pase activity in H4IIE hepatocytes, it was among the top Cree plants stimulating the phosphorylation of Akt and AMPK, two important kinases involved in hepatic metabolic control (Herzig, Long et al. 2001; Viollet, Mounier et al. 2007). Such an apparently important antidiabetic potential is consistent with recent *in vitro* and *in vivo* studies from our group with the same crude extract of *L. laricina* used in the present work. Indeed, *in vitro*, it stimulated glucose uptake (Spor, Martineau et al. 2006) and AMPK (Martineau, Adeyiwola-Spor et al. 2010) in C2C12 myocytes while enhancing adipogenesis in 3T3-L1 cells (Spor, Martineau et al. 2006). In the mouse diet-induced obesity model, *L. laricina* demonstrated a clear capacity to reduce glycemia and improve insulin resistance (Harbilas, Vallerand et al. 2012). The current study thus further validates the antidiabetic potential of *L. laricina* crude extracts and adds the liver as a putative target organ for the plant.

Finally, the results presented herein highlight the very strong action of *A. balsamea* on key enzymes and modulating kinases controlling hepatic glucose production. Indeed, the plant's crude extract reduced G6Pase and increased Akt phosphorylation to the same extent as insulin in H4IIE hepatocytes. It was also the most potent of all Cree plant extracts to enhance AMPK phosphorylation in the same cell line. Likewise, *A. balsamea* was the most potent activator of glycogen synthase in HepG2 cells when compared to other Boreal forest plant extracts, exerting an effect several fold higher than insulin. This action was also associated with an enhanced phosphorylation of the key kinase GSK-3. Hence, *A. balsamea* crude extract was the only Cree plant to simultaneously and potently affect the two major pathways involved in hepatic glucose homeostasis. Together with the prior *in vitro* demonstration of the ability of this plant to enhance glucose uptake in muscle and adipose cells (Spor, Martineau et al. 2006), this encourages more detailed study of the antidiabetic potential of the plant, notably through the determination of active principles and validation using *in vivo* animal models.

## **5-Conclusion**

In summary, this study confirmed that Boreal forest plants of the Cree traditional pharmacopeia have the potential to reduce hepatic glucose output and hence provide beneficial therapeutic action in the context of the obesity-diabetes continuum of metabolic diseases. Our results also

lend further support to the soundness of considering Cree traditional medicine and its associated medicinal plants as worthy complementary and alternative approaches to improve diabetes care and management; doing so in a culturally mindful and respectful manner.

## ***6-Acknowledgements***

This work was supported by a Team Grant from the Canadian Institutes of Health Research (CIHR Team in Aboriginal Antidiabetic Medicines) to PSH, JTA and AC, and by funding from the Biotechnology, Genomics and Population Health office of Health Canada. It was conducted with the consent and support of the Cree Nation of Mistissini, of the Whapmagoostui First Nation, Cree Nation of Nemaska, the Waskaganish First Nation and of the Cree Board of Health and Social Services of James Bay (Quebec, Canada). Very special thanks are due to the Elders and healers. They made this article possible by allowing us to use, for the purposes of this research, their knowledge relating to medicinal plants. Their trust has also enabled a useful exchange between Indigenous knowledge and Western science.



## 7-Tables and Figures

Table 1: Optimal concentrations of plant extracts used to treat H4IIE and HepG2 cells were determined by the LDH cytotoxicity.

<b>Plant extracts</b>	<b>Abbreviation Used</b>	<b>Concentrations in µg/mL</b>
<i>Abies balsamea</i>	Abies	50
<i>Kalmia augustifolia</i>	Kalmia	50
<i>Larix laricina</i>	Larix	25
<i>Sarracenia purpurea</i>	Sarra	25
<i>Sorbus decora</i>	Sorbus	15
<i>Juniperus communis</i>	Juniper	3,75
<i>Rhododendron tomentosum</i>	Rhod.T	50
<i>Rhododendron groenlandicum</i>	Rhod.G	50
<i>Gaultheria hispidula</i>	Gault	25
<i>Picea mariana</i>	Picea.M	10
<i>Picea glauca</i>	Picea.G	125
<i>Salix planifolia</i>	Salix	15
<i>Alnus incana</i>	Alnus	50
<i>Populus balsamifera</i>	Populus	100
<i>Lycopodium clavatum</i>	Lyco	100
<i>Pinus banksiana</i>	Pinus	10
<i>Vaccinium vitis</i>	Vitis	200

Figure 1: Effect of 17 plant extracts on the activity of G6Pase.

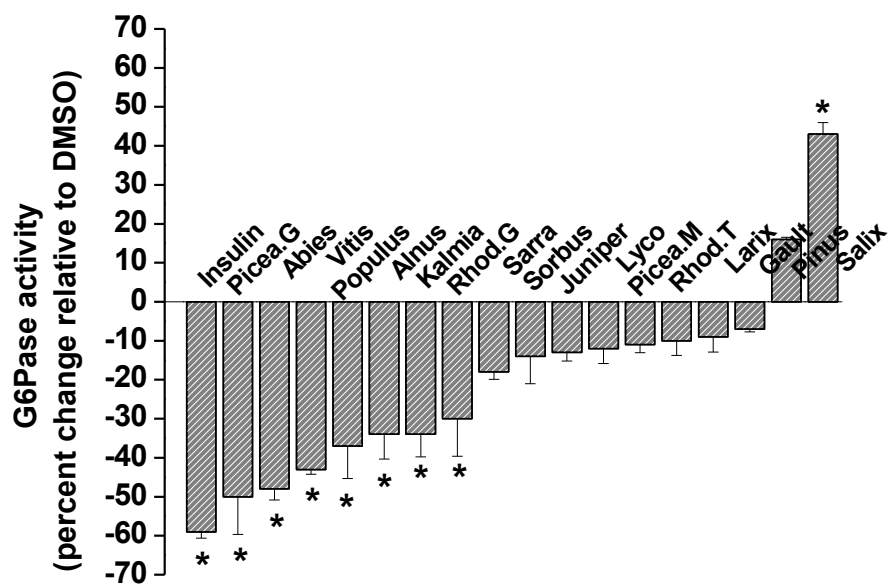


Figure 2: Effect of insulin and two plant extracts on G6Pase activity.

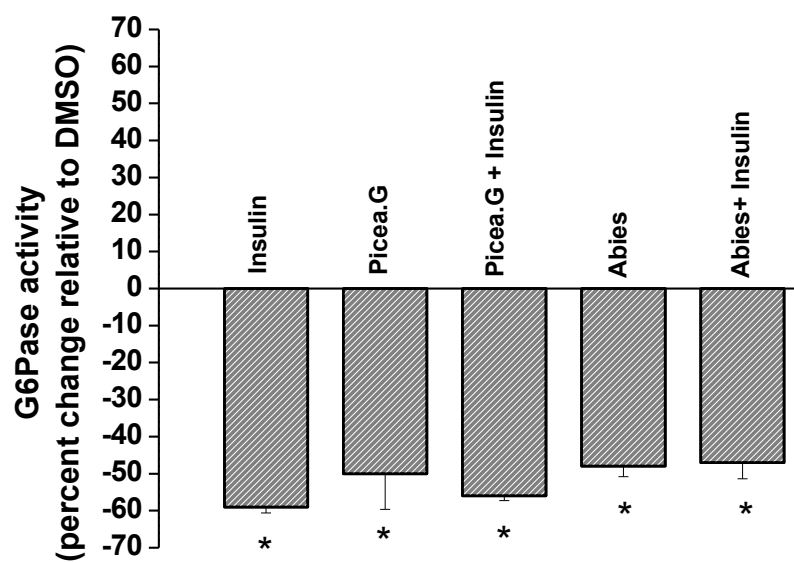


Figure 3A: Effect of 17 plant extracts on kinases regulating G6Pase activity. A) Phosphorylation of Akt.

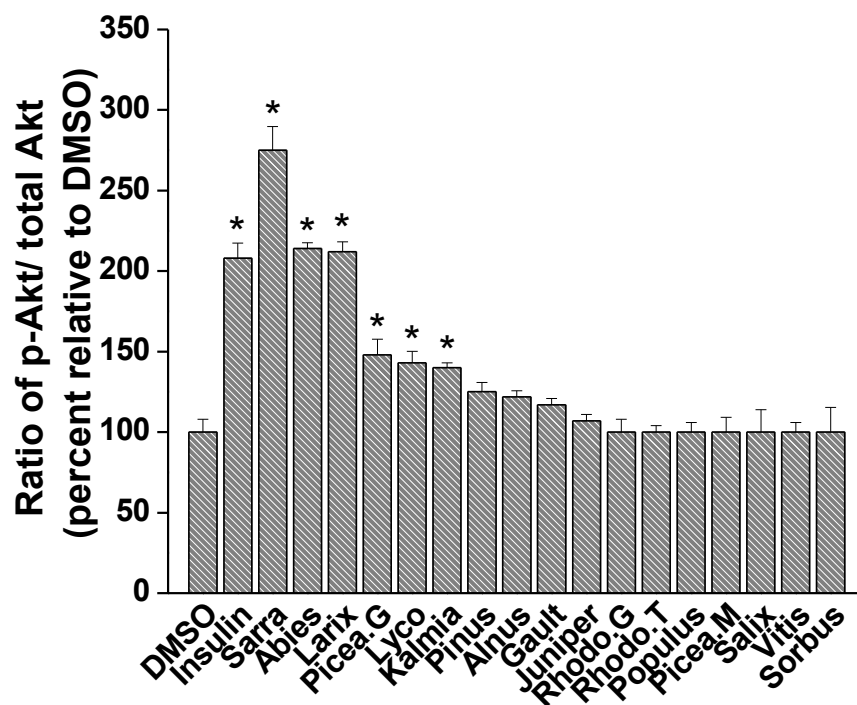


Figure 3B: Effect of 17 plant extracts on kinases regulating G6Pase activity. B)  
Phosphorylation of AMPK

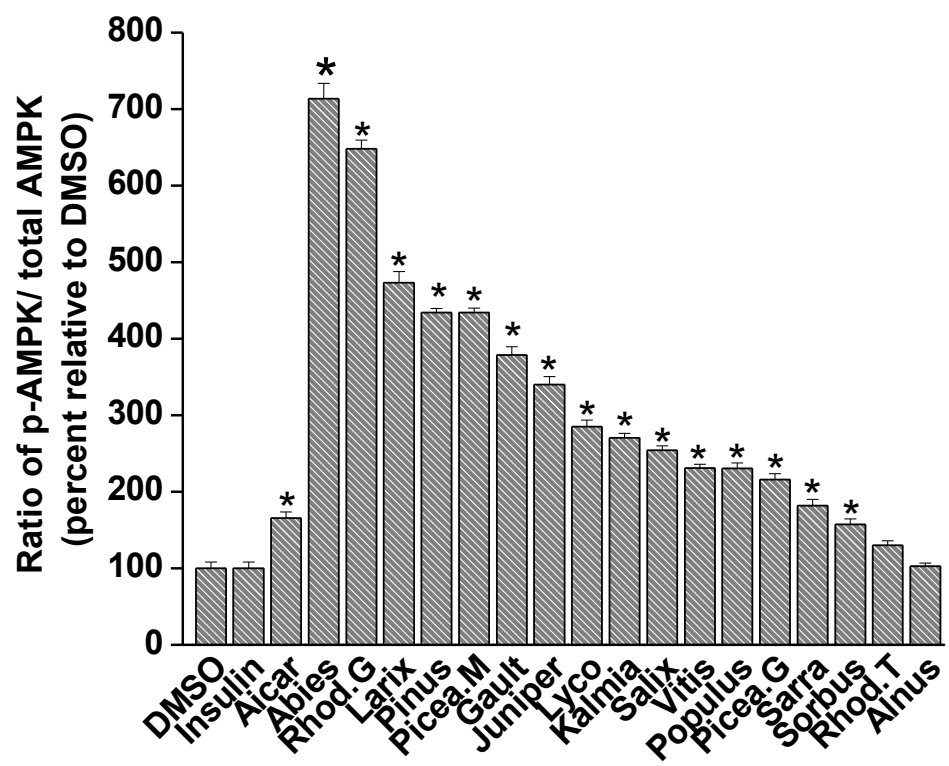


Figure 4A: Effect of 17 plant extracts on components involved in hepatic glucose storage. A)  
Activation of GS

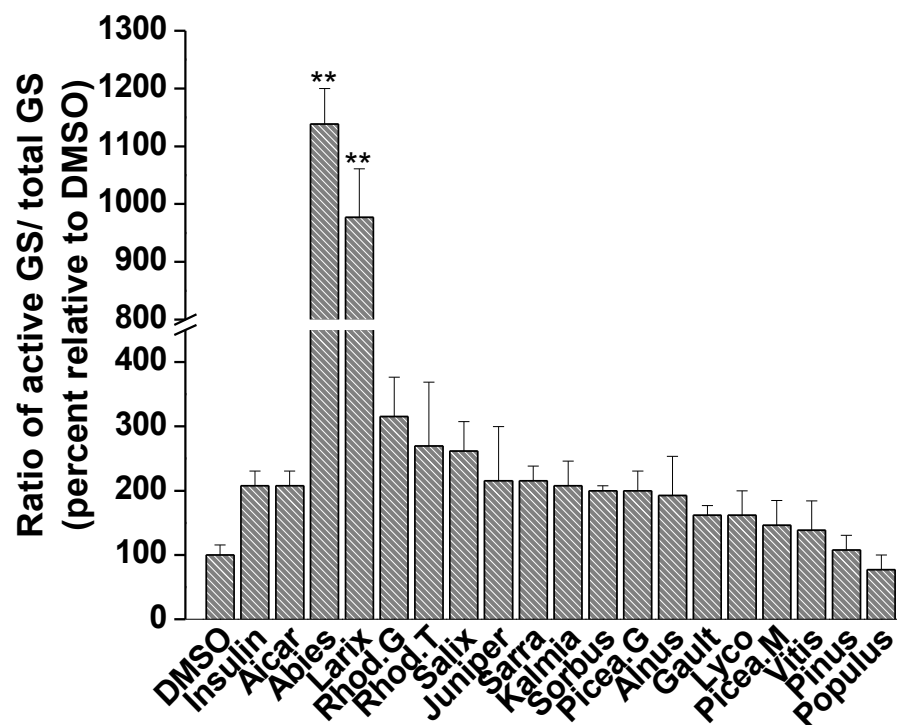
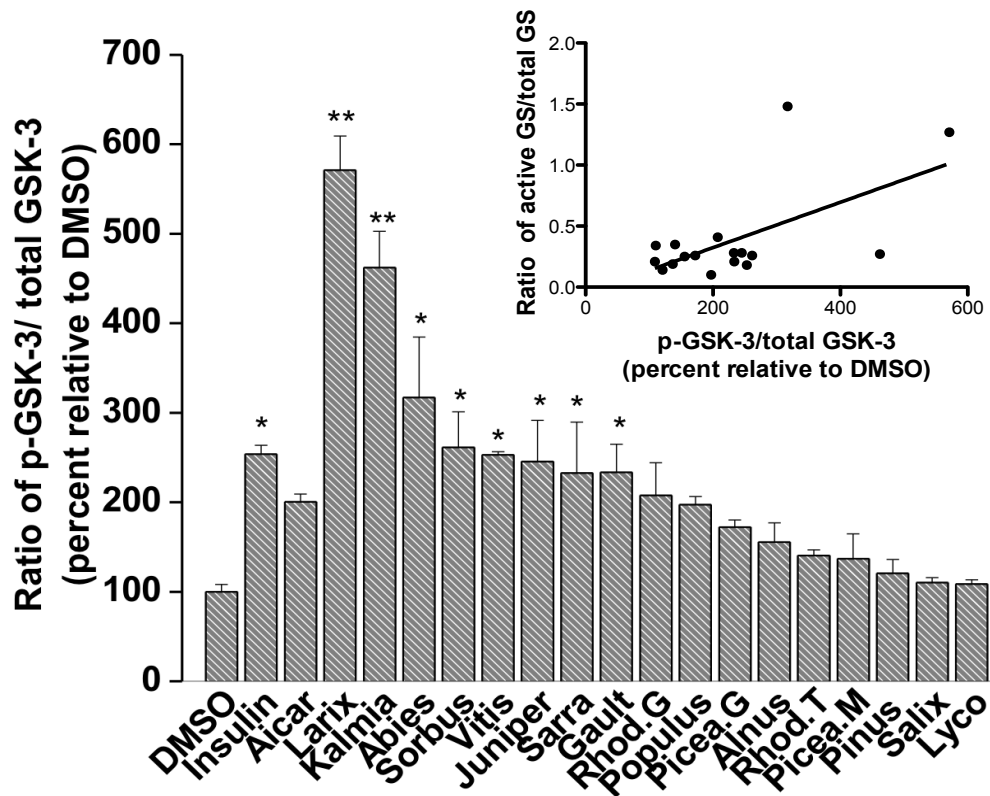


Figure 4B: Effect of 17 plant extracts on components involved in hepatic glucose storage. B)  
Phosphorylation of GSK-3



## 8- Table and Figure legends

Table 1: Optimal concentrations of plant extracts used to treat H4IIE and HepG2 cells were determined by the LDH cytotoxicity.

Figure 1: Effect of 17 plant extracts on the activity of G6Pase.

Results shown represent the change in G6Pase activity observed after overnight treatment of H4IIE cells with optimal non-toxic concentrations of indicated plant extracts. They are expressed relative to DMSO (0.1%) vehicle controls (0% inhibition). Assays were carried out in triplicate on three different cell cultures. Insulin (100nM) was used as a positive control. \*:  $p < 0.05$  Significantly different from DMSO vehicle control.

Figure 2: Effect of insulin and two plant extracts on G6Pase activity.

Results shown represent the change in G6Pase activity observed after overnight treatment of H4IIE cells with *Picea glauca* or *Abies balsamea* plant extracts in the presence or absence of insulin (100nM). They are expressed relative to DMSO (0.1%) vehicle controls (0% inhibition). Assays were carried out in triplicate on three different cell cultures. \*:  $p < 0.05$  Significantly different from DMSO vehicle control.

Figure 3: Effect of 17 plant extracts on kinases regulating G6Pase activity.

A) Phosphorylation of Akt. Phosphorylated (p-Akt) and total Akt were measured by Western blot in H4IIE cells treated with optimal non-toxic concentrations of indicated plant extracts. The ratio of p-Akt /total Akt is expressed as a percentage relative to values obtained for DMSO (0.1%) vehicle controls. Insulin (100nM) was used as a positive control. \*:  $p < 0.05$  Significantly different from DMSO vehicle control. B) Phosphorylation of AMPK. Phosphorylated (p-AMPK) and total AMPK were measured by Western blot in H4IIE cells treated with optimal non-toxic concentrations of indicated plant extracts. The ratio of p-AMPK/total AMPK is expressed as a percentage relative to values obtained for DMSO (0.1%) vehicle controls. AICAR (2mM) was used as a positive control. \*:  $p < 0,05$  Significantly different from DMSO vehicle control.



Figure 4: Effect of 17 plant extracts on components involved in hepatic glucose storage.

A) Activation of GS. Results shown represent the glycogen synthase (GS) activity observed after overnight treatment of HepG2 cells with optimal non-toxic concentrations of indicated plant extracts. They are expressed relative to DMSO (0.1%) vehicle controls (100% activity). Assays were carried out in triplicate on three different cell cultures. Insulin (100nM) and AICAR (2mM) were used as positive controls. \*\*:  $p < 0.01$  Significantly different from DMSO vehicle control. B) Phosphorylation of GSK-3. Phosphorylated (p-GSK-3) and total GSK-3 were measured by Western blot in HepG2 cells treated with optimal non-toxic concentrations of indicated plant extracts. The ratio of p-GSK-3/total GSK-3 is expressed as a percentage relative to values obtained for DMSO (0.1%) vehicle controls. Insulin (100nM) and AICAR (2mM) were used as positive controls. \*:  $p < 0.05$  and \*\*:  $p < 0.05$  Significantly different from DMSO vehicle control. Inset: Correlation between GSK-3 phosphorylation and activation of GS induced by the 17 plant extracts ( $r^2=0.36$ ,  $p<0.05$ ).

## 9-References

1. Efrat, S., *Beta-cell replacement for insulin-dependent diabetes mellitus*. Adv Drug Deliv Rev, 2008. **60**(2): p. 114-23.
2. Cheng, K.K., et al., *APPL1 potentiates insulin-mediated inhibition of hepatic glucose production and alleviates diabetes via Akt activation in mice*. Cell Metab, 2009. **9**(5): p. 417-27.
3. Edelman, S.V., S. Garg, and O.G. Kolterman, *Is pramlintide a safe and effective adjunct therapy for patients with type 1 diabetes?* Nat Clin Pract Endocrinol Metab, 2007. **3**(5): p. E1; discussion E2.
4. <http://www.diabetes.ca/diabetes-and-you/what/prevalence/>.
5. Ekoe, J.M., et al., *Epidemiology of obesity in relationship to some chronic medical conditions among Inuit and Cree Indian populations in New Quebec, Canada*. Diabetes Res Clin Pract, 1990. **10 Suppl 1**: p. S17-27.
6. Leduc, C., et al., *Plants used by the Cree Nation of Eeyou Istchee (Quebec, Canada) for the treatment of diabetes: A novel approach in quantitative ethnobotany*. J Ethnopharmacol, 2006. **105**(1-2): p. 55-63.
7. Fraser, M.H., et al., *Medicinal plants of Cree communities (Quebec, Canada): antioxidant activity of plants used to treat type 2 diabetes symptoms*. Can J Physiol Pharmacol, 2007. **85**(11): p. 1200-14.
8. Spoor, D.C., et al., *Selected plant species from the Cree pharmacopoeia of northern Quebec possess anti-diabetic potential*. Can J Physiol Pharmacol, 2006. **84**(8-9): p. 847-58.
9. Harbilas, D., et al., *Evaluation of the antidiabetic potential of selected medicinal plant extracts from the Canadian boreal forest used to treat symptoms of diabetes: part II*. Can J Physiol Pharmacol, 2009. **87**(6): p. 479-92.
10. Saltiel, A.R., *Diverse signaling pathways in the cellular actions of insulin*. Am J Physiol, 1996. **270**(3 Pt 1): p. E375-85.
11. Gonzalez, C., et al., *Investigational treatments for Type 2 diabetes mellitus: exenatide and liraglutide*. Expert Opin Investig Drugs, 2006. **15**(8): p. 887-95.

12. Watford, M., *Is the small intestine a gluconeogenic organ*. Nutr Rev, 2005. **63**(10): p. 356-60.
13. Puigserver, P., et al., *Insulin-regulated hepatic gluconeogenesis through FOXO1-PGC-1alpha interaction*. Nature, 2003. **423**(6939): p. 550-5.
14. Herzig, S., et al., *CREB regulates hepatic gluconeogenesis through the coactivator PGC-1*. Nature, 2001. **413**(6852): p. 179-83.
15. Rosella, G., et al., *Impaired suppression of gluconeogenesis induced by overexpression of a noninsulin-responsive phosphoenolpyruvate carboxykinase gene*. Mol Endocrinol, 1993. **7**(11): p. 1456-62.
16. Mues, C., et al., *Regulation of glucose-6-phosphatase gene expression by insulin and metformin*. Horm Metab Res, 2009. **41**(10): p. 730-5.
17. Gonzalez-Mujica, F., et al., *Inhibition of hepatic neoglucogenesis and glucose-6-phosphatase by quercetin 3-O-alpha(2''-galloyl)rhamnoside isolated from Bauhinia megalandra leaves*. Phytother Res, 2005. **19**(7): p. 624-7.
18. Schmoll, D., et al., *Regulation of glucose-6-phosphatase gene expression by protein kinase Balpha and the forkhead transcription factor FKHR. Evidence for insulin response unit-dependent and -independent effects of insulin on promoter activity*. J Biol Chem, 2000. **275**(46): p. 36324-33.
19. Hutton, J.C. and R.M. O'Brien, *Glucose-6-phosphatase catalytic subunit gene family*. J Biol Chem, 2009. **284**(43): p. 29241-5.
20. Martinez, A., et al., *Glycogen synthase kinase 3 (GSK-3) inhibitors as new promising drugs for diabetes, neurodegeneration, cancer, and inflammation*. Med Res Rev, 2002. **22**(4): p. 373-84.
21. Wang, Y. and P.J. Roach, *Inactivation of rabbit muscle glycogen synthase by glycogen synthase kinase-3. Dominant role of the phosphorylation of Ser-640 (site-3a)*. J Biol Chem, 1993. **268**(32): p. 23876-80.
22. Cross, D.A., et al., *The inhibition of glycogen synthase kinase-3 by insulin or insulin-like growth factor 1 in the rat skeletal muscle cell line L6 is blocked by wortmannin, but not by rapamycin: evidence that wortmannin blocks activation of the mitogen-*

- activated protein kinase pathway in L6 cells between Ras and Raf*. Biochem J, 1994. **303 ( Pt 1)**: p. 21-6.
23. Grimes, C.A. and R.S. Jope, *The multifaceted roles of glycogen synthase kinase 3beta in cellular signaling*. Prog Neurobiol, 2001. **65**(4): p. 391-426.
  24. Towler, M.C. and D.G. Hardie, *AMP-activated protein kinase in metabolic control and insulin signaling*. Circ Res, 2007. **100**(3): p. 328-41.
  25. Viollet, B., et al., *Targeting AMP-activated protein kinase as a novel therapeutic approach for the treatment of metabolic disorders*. Diabetes Metab, 2007. **33**(6): p. 395-402.
  26. Garriguet, D., *Obesity and the eating habits of the Aboriginal population*. Health Rep, 2008. **19**(1): p. 21-35.
  27. Hanley, A.J., et al., *Complications of Type 2 Diabetes Among Aboriginal Canadians: prevalence and associated risk factors*. Diabetes Care, 2005. **28**(8): p. 2054-7.
  28. Haddad, P.S., et al., *Comprehensive evidence-based assessment and prioritization of potential antidiabetic medicinal plants: a case study from canadian eastern james bay cree traditional medicine*. Evid Based Complement Alternat Med, 2012. **2012**: p. 893426.
  29. Yoon, J.C., et al., *Control of hepatic gluconeogenesis through the transcriptional coactivator PGC-1*. Nature, 2001. **413**(6852): p. 131-8.
  30. Zhang, W., et al., *FoxO1 regulates multiple metabolic pathways in the liver: effects on gluconeogenic, glycolytic, and lipogenic gene expression*. J Biol Chem, 2006. **281**(15): p. 10105-17.
  31. Postic, C., R. Dentin, and J. Girard, *Role of the liver in the control of carbohydrate and lipid homeostasis*. Diabetes Metab, 2004. **30**(5): p. 398-408.
  32. Zang, M., et al., *AMP-activated protein kinase is required for the lipid-lowering effect of metformin in insulin-resistant human HepG2 cells*. J Biol Chem, 2004. **279**(46): p. 47898-905.
  33. He, L., et al., *Metformin and insulin suppress hepatic gluconeogenesis through phosphorylation of CREB binding protein*. Cell, 2009. **137**(4): p. 635-46.

34. Martineau, L.C., et al., *Enhancement of muscle cell glucose uptake by medicinal plant species of Canada's native populations is mediated by a common, metformin-like mechanism.* J Ethnopharmacol, 2010. **127**(2): p. 396-406.
35. Thomas, J.A., K.K. Schlender, and J. Larner, *A rapid filter paper assay for UDPglucose-glycogen glucosyltransferase, including an improved biosynthesis of UDP-14C-glucose.* Anal Biochem, 1968. **25**(1): p. 486-99.
36. Van Wauwe, J. and B. Haefner, *Glycogen synthase kinase-3 as drug target: from wallflower to center of attention.* Drug News Perspect, 2003. **16**(9): p. 557-65.
37. Cohen, P. and M. Goedert, *GSK3 inhibitors: development and therapeutic potential.* Nat Rev Drug Discov, 2004. **3**(6): p. 479-87.
38. Harris, C.S., et al., *Plant phenolics regulate neoplastic cell growth and survival: a quantitative structure-activity and biochemical analysis.* Can J Physiol Pharmacol, 2007. **85**(11): p. 1124-38.
39. Harbilas, D., et al., *Larix laricina, an Antidiabetic Alternative Treatment from the Cree of Northern Quebec Pharmacopoeia, Decreases Glycemia and Improves Insulin Sensitivity In Vivo.* Evid Based Complement Alternat Med, 2012. **2012**: p. 296432.

## **Chapitre 3. Article 2**

# **Regulation of hepatic glucose homeostasis by dehydroabietic acid, abietic acid and squalene isolated from balsam fir (*Abies balsamea* (L.) Mill.) a plant of the Eastern James Bay Cree traditional pharmacopeia**

### **Auteurs**

Abir Nachar <sup>1,2</sup>, Ammar Saleem <sup>2,3</sup>, John T. Arnason <sup>2,3</sup>, Pierre S. Haddad<sup>1,2</sup>

### **Affiliations**

<sup>1</sup> Natural Health Products and Metabolic Diseases Laboratory, Dept. of Pharmacology, Université de Montréal, Montreal, QC, Canada

<sup>2</sup> Canadian Institutes of Health Research Team in Aboriginal Antidiabetic Medicines and Montreal Diabetes Research Center, Canada

<sup>3</sup> Laboratory for the Analysis of Natural and Synthetic Environmental Toxins, University of Ottawa, Ottawa, ON, Canada

Cet article a été soumis au journal Diabetes, Obesity and Metabolism le 30 octobre 2014.

## **Contribution de chaque co-auteur**

J'ai effectué tous les travaux expérimentaux, l'analyse des données ainsi que la rédaction de l'article.

Ammar Saleem, sous la supervision du Dr John.T Arnason, a effectué le fractionnement phytochimique de l'extrait d'*Abies balsamea*, l'identification et l'isolement de ses constituents.

Dr Pierre S. Haddad est mon directeur de recherche qui m'a supervisé tout le long de ma période d'études. Il a initié le cadre conceptuel du projet, aidé dans l'interprétation des données et corrigé l'article.

## **Abstract**

In our previous study, *Abies balsamea*, a plant used in Cree traditional medicine had a strong effect on the regulation of hepatic glucose homeostasis. This study aimed to isolate and identify its active constituents using a bioassay-guided fractionation approach as well as to elucidate their mechanism(s) of action. We evaluated the effect of the crude extract and its constituents on the activity of glucose-6-phosphatase (G6Pase) and glycogen synthase (GS) and phosphorylation of three kinases, AMP-activated protein kinase (AMPK), Akt and glycogen synthase kinase-3 (GSK-3). Three compounds, Abietic acid (AA), dehydroabietic acid (DAA) and squalene (SQ), were isolated from the most active fraction in the bioassays (Hexane). The compounds were able to decrease the activity of G6Pase and to stimulate GS. Their effect on G6Pase activity involved both Akt and AMPK phosphorylation with significant correlations between insulin-dependent and -independent pathways and the bioassay. In addition, the compounds were able to stimulate GS through GSK-3 phosphorylation with a significant correlation between the signaling pathway and the bioassay. DAA stood out by its strongest effect in all the experiments close to that of the crude extract. These compounds may have potential applications in the treatment of type 2 diabetes and insulin resistance.

**Keywords:** type 2 diabetes, *Abies balsamea*, Abietic acid, dehydroabietic acid, squalene, Glucose-6-phosphatase, glycogen synthase, Akt, AMPK, GSK-3.



**Abbreviations:**

AA: Abietic acid

AMPK: AMP-activated protein kinase

CREB: c-AMP-regulator element-binding protein

DAA: Dehydroabietic acid

EtOAc: ethyl acetate fraction

FoxO1: Forkhead transcription factor O1

G6Pase: Glucose-6-Phosphatase

GS: Glycogen Synthase

GSK-3: Glycogen Synthase kinase-3

Hexane: Hexane fraction

HNF4: Hepatic Nuclear Factor 4

H<sub>2</sub>O: Aqueous fraction

MeOH: methanol fraction

PEPCK: Phospho-enol pyruvate carboxykinase

PGC-1alpha: Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha

PP1: Protein Phosphatase 1

PPAR gamma: Peroxisome proliferator-activated receptor gamma

SQ: Squalene

## **1-Introduction**

Type 2 diabetes, the most common type of diabetes, is caused by a decreased insulin sensitivity in target organs like liver, muscle and adipose tissue, and a deficiency in insulin secretion (Cheng, Iglesias et al. 2009). Aside from reduced peripheral glucose disposition (mostly skeletal muscle uptake), increased hepatic glucose production is a major contributor to diabetic hyperglycemia. Insulin regulates the expression of genes encoding main enzymes implicated in hepatic gluconeogenesis and glycolysis (Pilkis and Granner 1992). It inhibits the transcription of genes encoding fructose-1,6-biphosphatase and glucose-6-phosphatase (G6Pase) mainly through the activation of the kinase Akt and the phosphorylation of some transcription factors, like forkhead transcription factor O1 (FoxO1) and Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha (PGC-1alpha), involved in the expression of these enzymes (Yoon, Puigserver et al. 2001; Puigserver, Rhee et al. 2003).

Glycogen synthase kinase-3 (GSK-3) inhibits glycogen synthase (GS) through phosphorylation (Wang and Roach 1993). The insulin pathway activates GS through phosphorylation and inhibition of GSK-3 and activation of protein phosphatase 1 (PP1) (Cross, Alessi et al. 1995; Brady, Nairn et al. 1997). G6Pase is the rate-limiting enzyme of gluconeogenesis (Schmoll, Walker et al. 2000) and GS is the enzyme responsible for glucose storage as glycogen in liver and muscle. Therefore, both control hepatic glucose production and storage were evaluated in this study as markers for potential antidiabetic activity.

AMP-activated protein kinase (AMPK), key regulator of insulin-independent pathways, is also involved in hepatic glucose homeostasis (Towler and Hardie 2007). It is considered to be the target of Metformin, the most commonly used oral hypoglycemic drug worldwide. Once phosphorylated, AMPK is activated and leads to the inhibition of gluconeogenesis and

stimulation of glucose storage as glycogen (Viollet, Mounier et al. 2007). Both insulin-dependent (Akt) and –independent pathways (AMPK) are thus involved in regulating hepatic glucose production.

According to the International Diabetes Federation (IDF), 382 million people are living with diabetes; this number will reach 592 in 2035. 80% of diabetic people are living in low- and middle-income countries and most of them are aged between 40 and 59 (IDF 2013). Aboriginal populations are at higher risk to develop type 2 diabetes than the general Canadian populations (Ekoe, Thouez et al. 1990; Hegele 2001).

In a recent screening study of seventeen antidiabetic plants used by the Eastern James Bay Cree (Canada), we showed that *Abies balsamea* stood out for marked effects on hepatic glucose homeostasis. *A. balsamea* decreased G6Pase activity, involving both Akt and AMPK phosphorylation, and simultaneously stimulated GS activity by inhibiting GSK-3 (Nachar, Vallerand et al. 2013). In continuity, we now sought to elucidate the active principles responsible of the antidiabetic effect of *A. balsamea*.

As mentioned, *A. balsamea* was found to have the most promising profile to inhibit hepatic glucose production through simultaneous and powerful G6Pase inhibition and GS stimulation (Nachar, Vallerand et al. 2013). Therefore, the present study aimed to elucidate the active principles of this plant using a bioassay-guided fractionation and to evaluate their effect on key enzymes of gluconeogenesis and glycogen synthesis as well as key kinases regulating these enzymes.

## **2-Material and methods**

### **2.1-Cell culture**

H4IIE (rat hepatoma) and HepG2 (human hepatoma) cell lines used were purchased from American Type Culture Collection (ATCC). H4IIE cells were grown in a high glucose Dubelcco's Modified Eagle Medium (DMEM) containing 10% Fetal Bovin Serum (FBS) and 0.5% antibiotics (PS: Penicillin 100 U/mL, Streptomycin 100 µg/mL) whereas HepG2 cells were grown in DMEM/F12 (50/50) medium, containing 10% FBS and 0.5% PS. The cells were left in the incubator at 37°C, 5% CO<sub>2</sub> until 90% confluent then treated with the different samples and managed for the experiments.

### **2.2-Bioassay-guided isolation and compound identification by LC-MS/MS**

The bark of *A. balsamea* L. (Mill.) was collected in Cree Eeyou Istchee territory (Eastern James Bay area of Quebec, Canada) following instructions of healers. Montreal Botanical Garden taxonomist Dr Alain Cuerrier carried out the botanical identification and a voucher specimen was deposited in the herbarium of the Garden. The bark was air-dried and milled through a Wiley Mill (4 mm mesh). Crude ethanol extract of *A. balsamea* was carried out as described previously (Spoor, Martineau et al. 2006). Powdered material was otherwise subjected to fractionation with hexane, ethyl acetate, methanol and water (1.0 Kg / 10 L). Resulting fractions were tested in bioassays described below. Hexane fraction was further subjected to preparative scale isolation on a 1200 series HPLC-DAD system equipped with an online fraction collector (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) on a reversed phase gradient chromatography on Gemini 21 mm × 250 mm, 5µM particle size column

(Phenomenex Inc., Torrance, CA, USA). Mobile phase composition consisted of MilliQ water (A) and HPLC grade acetonitrile (B) which was delivered at 40 mL/min using a linear gradient of 30-100% B in 20 min. The fraction collection was peak based. The peaks were collected after adjustment of lower and upper threshold of signals detected at a monitoring wavelength of 210 nm, bandwidth 4 nm, reference off. Peak purity was checked at 210 nm, 254 nm 320 nm and 400 nm.

The identity of the isolated peaks was confirmed by co-chromatography and spectrometry using authentic standards. Abietic acid (AA), Dehydroabietic acid (DHA) and Squalene (SQ) (>95% purity) were purchased from Sigma Aldrich St. (Louis, MO, USA). LC-MS/MS analyses were performed on a API 2000 triple quadrupole mass spectrometer (ABSciex, Concord, ON, Canada) connected with a LC-2010HT Shimadzu HPLC system (Mandel Scientific, Guelph, ON, Canada). Ionization of target compounds was achieved by electrospray source in positive mode using a linear gradient of B 30-100% in 20 min at a flow rate of 0.5 mL/min on a Kinetex 2.3 mm × 100 mm, 3.0 µm particle size column (Phenomenex Inc., Torrance, CA, USA). Column thermostat temperature was maintained at 40°C. Q1M1 scans were performed at unit resolution. Electrospray source conditions were: N<sub>2</sub> curtain gas pressure 20 psig, source temperature 300°C, declustering potential 70 V, gas 1 and gas 2 settings were 35 psig and 40 psig respectively and capillary current was set at +4000V.

### **2.3-Cytotoxicity assay (LDH)**

As described previously (Nachar, Vallerand et al. 2013), the maximal non-toxic concentrations of plant extracts and pure compounds were determined by a cytotoxicity assay, the lactate dehydrogenase (LDH) kit (LDH Colorimetric Kit; Roche, Mannheim, Germany). After

overnight treatment (16-18h) with the plant extract, the fractions or the pure compounds at different concentrations, the culture media were collected separately for each condition and kept on ice (representing released LDH from cells). Then the cells were lysed by adding culture medium with 1 % Triton, for 10 minutes at 37°C, 5% CO<sub>2</sub> (representing cellular LDH). All the samples were kept on ice in Eppendorf tubes then centrifuged at 250xg, 4°C for 10 minutes. The ratio of released LDH to total LDH (total LDH= released LDH + cellular LDH) was calculated for each condition and the results normalized to values obtained from vehicle control (DMSO 0.1%) treated cells to determine maximal non-toxic concentrations for each sample.

#### **2.4-Hepatic glucose production**

H4IIE cell line was used to measure the activity of G6Pase. Confluent cells were treated with DMSO 0.1% (negative control), Insulin 100 nM (positive control), *A.balsamea* extract, fractions or pure compounds at their respective maximal non-toxic concentrations for 18h. After the treatment, cells were rinsed, then lysed using a 15 mM Phosphate buffer containing 0.05% Triton and 1.3 mM Phenol (pH = 6.5). Then a glucose-6-phosphate (G6P)-containing buffer (200 mM; substrate for G6Pase) was added to the cell lysates for 40 min at 37°C. The quantity of glucose generated was measured with the Wako AutoKit Glucose colorimetric assay (Wako Chemicals USA Inc, Richmond, VA) according to manufacturers' recommendations. BCA method was used to determine the protein content for each condition. Results are expressed relative to vehicle control (DMSO 0.1%).

## 2.5-Glycogen Synthase activity

HepG2 cells exhibit a better expression of GS than H4IIE hepatocytes and were thus selected to explore the activity of this enzyme (Thomas, Schlender et al. 1968). Upon reaching confluence in 6-well plates, cells were treated for 18h with vehicle control (DMSO 0.1%), *A. balsamea* extract, fractions or pure compounds at their respective maximal non-toxic concentrations. Insulin administered at 100nM for 15 minutes was used as a positive control in this assay. After 18h of treatment cells were washed then lysed in a buffer solution containing 50 mM glycylglycine, 100 mM sodium fluoride, 20 mM EDTA, 0.5% glycogen, pH 7.4 and a complete protease inhibitor cocktail. The lysates were centrifuged at 1000xg for 20 minutes at 4°C. 30 uL of supernatant from each condition were added to 100 uL of a specific buffer solution to measure the active GS (25 mM glycylglycine, 0.275 mM UDP-glucose, 0.12 uCi/mL U-<sup>14</sup>C UDP-glucose, 1% glycogen, 1 mM EDTA, 10 mM sodium sulfate, pH 7.5) and another 30 uL of supernatant were added to 100 uL of a specific buffer solution to measure the total GS (25 mM Tris, 5 mM UDP-glucose, 0.12 uCi/mL U-<sup>14</sup>C UDP-glucose, 1% glycogen, 3 mM EDTA, 5 mM glucose-6-phosphate, pH 7.9). Tubes were incubated in a water bath at 30°C for 120 minutes. After incubation, 90 uL of the mix for each condition was transferred on Whatman paper (Whatman 31 ET chr 2 cm<sup>2</sup>). The papers were rinsed with cold ethanol (4°C) for 30 minutes then twice with ethanol 66% at room temperature for 30 minutes. After removing the ethanol, the papers were covered with acetone for 2-3 minutes. Once dry, papers were transferred into scintillation vials. The resulting <sup>14</sup>C radioactivity was counted using a β-counter (LKB Wallac 1219; Perkin Elmer, Woodbridge, Ont., Canada).

## 2.6-Western blot

H4IIE and HepG2 cells were cultured in 6-well plates then treated with the different samples for 18h. After treatment 250  $\mu$ L of RIPA (RadioImmun Precipitation Assay) buffer containing 0.1 M Hepes, 0.3 M NaCl, 10 mM EGTA, 4 mM  $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , 10% glycerol, 2% Triton X-100, 0.2% SDS, 2 mM PMSF, 10 mM NaF, 100  $\mu$ M Na-orthovanadate and 1 mM Na-pyrophosphate were added to each well to lyse the cells. Cell lysates were transferred into Eppendorf tubes then centrifuged at 12000xg, 4°C, for 12 minutes. The supernatants were collected and used for western blot analysis. 40  $\mu$ g of proteins from each sample were loaded onto electrophoresis gel then transferred to nitrocellulose membrane (Millipore, Bedford, MA). The membranes were blocked for 2 hours in TBST (20 mM Tris, pH 7.6, 137 mM NaCl, 0.1% Tween-20) + 5% milk. The following antibodies were used to test different signaling pathways: p-GSK-3 (Ser 9), GSK-3 (1:1000, 5% milk, Millipore, Bedford, MA). Secondary antibody: anti-rabbit (1:50000, 5% milk, Jackson). p-AMPK $\alpha$  (Thr 172) (1:350, 5% BSA, Cell Signaling Technology, Danvers, MA), AMPK (1:500, 5% BSA, Cell Signaling Technology, Danvers, MA). Secondary antibody: anti-rabbit (1:4000, 5% BSA, Jackson). p-Akt (Thr 308) (1:1000, 5% BSA, Cell signaling Technology, Danvers, MA), Akt (1:1000, 5% BSA, Cell Signaling Technology Danvers, MA). Secondary antibody: anti-rabbit (1:10000, 5% BSA, Jackson). Membranes were transferred into small bags and incubated with primary antibodies overnight at 4°C then with secondary antibodies for 1 hour at room temperature. Finally the ECL Plus western blot detection system (Perkin Elmer, Woodbridge, Canada) and densitometry were used to measure the specific bands for each protein.



## **2.7- Statistical analysis**

All data are reported as the mean  $\pm$  SEM of 3 different experiments with triplicate for each sample. Results were analyzed by one-way analysis of variance (ANOVA) using StatView software (SAS Institute Inc., Cary, NC). A  $p$  value  $\leq 0.05$  was considered statistically significant.

## **3-Results**

### **3.1- LDH test (cytotoxicity)**

H4IIE and HepG2 cells were treated overnight (16-18 h) with the crude extract of *A. balsamea*, its solvent fractions, HPLC peaks and pure compounds at various concentrations and the LDH released was measured. Maximal non-toxic concentrations for each sample are shown in Table 1 and were used for all subsequent experiments.

### **3.2- The effect of *A. balsamea* on hepatic glucose production and glucose storage is associated primarily with the hexane fraction**

As observed previously (Nachar, Vallerand et al. 2013), *A. balsamea* crude extract exerted an inhibitory effect on G6Pase (48% decrease) similar to that of the positive control, insulin, (56% reduction). When this crude extract was fractionated using solvents of increasing polarity, bioactivity was associated primarily with the hexane fraction (50% inhibition), whereas EtOAc and MeOH showed intermediate inhibition (23%) and the aqueous fraction had a non significant effect on G6Pase activity (13% inhibition) (Figure 1A).

In terms of GS activity, the MeOH fraction was without effect whereas the aqueous and EtOAc solvent fractions activated GS to an extent similar to that of the positive control (activation by 2-

fold compared to DMSO, Figure 1B). In contrast, *A.balsamea* crude extract and its hexane fraction stood out with 14- and 50-fold activation respectively compared to DMSO.

### **3.3- Bioassay-guided subfractionation of the hexane solvent fraction.**

G6Pase and GS activity bioassays were used to guide further fractionation of the hexane fraction. Preparative scale isolation of this fraction yielded eight isolates (PK1-PK8) listed in Table 2 (compound identification). We developed and applied LC MS analyses to identify diterpenes that are known to be predominantly present in non-polar fraction of coniferous plants including *A. balsamea* (Saleem, Harris et al. 2010). We used our plant metabolomics spectral library of over 200 compounds with a special focus on resin acids that have been previously isolated by our group and reported to be present in *A. balsamea* cones and bark (Guerrero-Analco, Martineau et al. 2010; Hall, Zerbe et al. 2013). We confirmed the presence of DAA, AA and SQ eluting at 11.0 min, 12.0 min and 12.7 min respectively based on the similarity of protonated molecular ions and the fragments. Besides the three resin acids mentioned PK3, PK7 and PK8 showed protonated molecular ions and similar fragments as DAA and were putatively assigned as the derivatives of DAA.

When tested in the G6Pase bioassay, seven of the eight peaks demonstrated varied yet statistically significant inhibitory potential that ranged from 14% to 51% when compared to vehicle control (0.1% DMSO; 0% inhibition reference; Figure 2A). Similarly, six out of the eight subfractions stimulated GS activity 1.5- to 2.5-fold compared to vehicle control (0.1% DMSO; 100% activation reference; Figure 2B). In both assays, PK1, PK2, PK3, PK4 and PK5 appeared to have more important effects on the activity of G6Pase and GS than the three

others. This led us to further characterize these five peaks.

### **3.4- Identification of dehydroabietic acid as the most active compound acting on key enzymes of hepatic glucose production**

As mentioned, the analysis of the most active peaks led us to isolate three major compounds, which were tested for the G6Pase and the GS assays. AA and SQ similarly decreased G6Pase activity by 19% and 18%, respectively, whereas DAA was the most active compound with 27% decrease of the G6Pase activity compared to the vehicle control DMSO (0.1%) (Figure 3A). Likewise, AA and SQ stimulated GS activity 6.5 and 3.8 fold, respectively, whereas DAA far exceeded these effects, increasing GS activity 17 fold compared to DMSO (Figure 3B). DAA was thus the most active compound in both bioassays representing hepatic glucose production and storage, respectively.

### **3.5- Inhibition of G6Pase activity by bioactive compounds involves both insulin-dependent and -independent pathways.**

*A.balsamea* and its hexane fraction had the same effect as the insulin positive control on the phosphorylation of Akt, They increased the ratio of p-Akt/total Akt almost 2.2 fold compared to DMSO (Figure 4A). The three compounds also induced Akt phosphorylation in the same rank order as G6Pase inhibition; AA, SQ and DAA respectively increasing p-Akt/total Akt ratio by 1.6-, 1.5- and 2-fold. Indeed, we found for all samples a significant and highly linear correlation between Akt signaling pathway and G6Pase inhibition ( $R^2 = 0.92$ ;  $p < 0.05$ ; Figure 4B).

We also tested the insulin-independent pathway by measuring the ratio of p-AMPK/total AMPK and used the 5-Aminoimidazole-4-carboxamide-1- $\beta$ -D-ribofuranoside (AICAR) as a positive control (2.3 fold increase compared to DMSO; Figure 4C). *A. balsamea* and its hexane fraction exceeded AICAR's effect with 3- and 2.8-fold increases, respectively. The three compounds all had effects similar to the AICAR control, namely 2.2- to 2.3 -fold increases of AMPK phosphorylation compared to DMSO (Figure 4C). As was the case for insulin-dependent Akt activation, we found a significant and very linear correlation between the phosphorylation of AMPK and the activity of G6Pase modulated by all samples ( $R^2 = 0.82$ ;  $p < 0.05$ ; Figure 4D).

### **3.6- Bioactive compounds of *A. balsamea* activate GS through GSK-3 phosphorylation.**

We assessed GSK-3 phosphorylation in order to relate it to the stimulation of GS by *A. balsamea* extract, its hexane fraction and three major bioactives. We also used insulin as a positive control, which increased GSK-3 phosphorylation over 2-fold compared to DMSO (Figure 5A). The plant's crude extract and hexane fraction exceeded the effect of the positive control; yielding around 3 and 4.7 fold increases, respectively. In contrast, compounds AA and SQ increased GSK-3 phosphorylation similarly to the insulin, whereas DAA appeared slightly more potent with a 2.8-fold rise in p-GSK-3/total GSK-3 ratio compared to DMSO (Figure 5A). Like what we observed with G6Pase activity, we found a significant correlation between the effects of *A. balsamea* derivatives on the bioassay and its corresponding signaling pathway ( $R^2 = 0.96$ ,  $p < 0.01$ ) (Figure 5B).

#### 4-Discussion

Type 2 diabetes is a chronic disease characterized by a deficiency in insulin secretion by pancreatic cells and altered insulin sensitivity in peripheral tissues like the liver, muscle and adipose tissues (Cheng, Iglesias et al. 2009). According to the world Health Organization (WHO), diabetes will be the seventh cause of death in 2030 (WHO 2011). Aboriginal populations, like the Eastern James Bay (Eeyou Istchee) Cree in Canada, have a higher prevalence of diabetes and its complications than their non-Aboriginal peers (Ekoe, Thouez et al. 1990; Hegele 2001).

In a recent screening study on seventeen plants used in the traditional medicine of the Cree of Eeyou Istchee, we identified *A. balsamea* as a most promising antidiabetic plant because it significantly reduced G6Pase activity and strongly stimulated GS (Nachar, Vallerand et al. 2013). Indeed, impaired hepatic glucose production and storage are two important factors contributing to the pathogenesis of the obesity-diabetes disease continuum (Wang and Roach 1993; Hutton and O'Brien 2009). These previous results led us to do further work in order to isolate potential active fractions and principles and to evaluate their effect on hepatic glucose homeostasis in cultured hepatocytes. G6Pase was selected because it is the rate-limiting enzyme for gluconeogenesis (Schmoll, Walker et al. 2000), whereas GS plays the same role for glucose storage (Wang and Roach 1993). We also chose to examine key kinases that regulate the activity of these enzymes in the insulin-dependent pathway, namely Akt and GSK-3 (Van Wauwe and Haefner 2003). An insulin-independent pathway also controls gluconeogenesis and its key enzymes. It implicates AMPK, an important kinase implicated in energy balance (Towler and Hardie 2007; He, Sabet et al. 2009) that we thus also measured.

Initially, we used four solvents of increasing polarity (hexane, EtOAc, MeOH and H<sub>2</sub>O) to fractionate *A. basalmifera* and tested the effect of these fractions on the selected key enzymes. The results of both assays (G6Pase and GS) confirmed that the hexane fraction exhibited the most important effect; halving G6Pase activity and stimulating GS 50-fold. Therefore, further fractionation of the hexane extract was carried out, guided by G6Pase and GS activity assays. Using preparative scale HPLC, eight peaks were obtained and tested in both enzymatic assays. Most of these peaks (7 peaks) were able to significantly decrease G6Pase activity (decrease from 14 to 51%) and to stimulate GS (1.5- to 2.5-fold). PK1, PK2, PK3, PK4 and PK5 had the most important effects in both assays. According to the LC-MS/MS analysis, these peaks, albeit distinct, showed some similarities in their constituents. We found that most of them contained three major compounds, namely Abietic acid (AA), dehydroabietic acid (DAA) and squalene (SQ). They all belong to the terpene family, which includes a large number of organic compounds found in a variety of plants and trees. Terpenoids are considered as multifunctional natural compounds.

Indeed, AA exhibited many beneficial effects like an anti-inflammatory effect *in vivo* (Fernandez, Tornos et al. 2001) and in macrophages *in vitro* (Takahashi, Kawada et al. 2003), regulation of lipid metabolism (Takahashi, Kawada et al. 2003), and treatment of allergic reactions (Ulus, Ercil et al. 2002). A recent *in vivo* study showed that AA has an anti-obesity effect in mice fed a high-fat diet and this by regulating adipogenesis (Hwang, Ahn et al. 2011). Similarly, DAA also regulates inflammation in macrophages and adipocytes (Kang, Hirai et al. 2008), activates Peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma) and stimulates glucose uptake in adipocytes (Takahashi, Yao et al. 2011). Furthermore, an *in vivo* study showed that DAA improves diabetes and hyperlipidemia in obese diabetic KK-Ay mice

(Kang, Hirai et al. 2009). For its part, squalene, an isoprenoid compound, has been reported to be an oxygen scavenging agent (Saint-Leger, Bague et al. 1986) and to have antitumor properties and immune enhancing activities (Newmark 1997; Reddy and Couvreur 2009).

However, none of the compounds had, to our knowledge, been tested for actions on hepatic glucose homeostasis. Our G6Pase assay showed that all three compounds were able to significantly decrease the activity of the enzyme. The most potent, DAA, had roughly half the activity of the insulin positive control, the *A. balsamea* crude extract or its hexane fraction. Interestingly, the two latter as well as the three compounds significantly activated the phosphorylation of Akt; effects ranging from 1.5- to 2.2-fold (the effect of the insulin control). In fact, linear correlation analysis revealed that the phosphorylation of Akt induced by the tested samples could directly explain their ability to decrease G6Pase activity ( $R^2=0.92$ ,  $p < 0.05$ ). Similarly, the crude extract, the hexane fraction and the three compounds stimulated the phosphorylation of AMPK; effects ranging from 2.2- to 3-fold (compared with a 2.3-fold effect of the positive control AICAR). As with Akt, the phosphorylation of AMPK induced by the samples could explain their ability to decrease G6Pase activity ( $R^2=0.82$ ,  $p < 0.05$ ). Such results imply that *A. balsamea*, its hexane fraction and its three active compounds are using both insulin-dependent and -independent pathways to regulate the activity of G6Pase (release of glucose from liver).

In the GS bioassay, all three *A. blasamifera* bioactives also stimulated the enzyme's activity; DAA being most potent (17-fold increase, similar to the crude extract's effect) while AA and SQ were close to the insulin positive control (3- to 6- fold). When we assessed GSK-3 activation, the rank order of potency was maintained. In fact, a highly linear relationship was found between the capacity of *A. balsamea* samples to phosphorylate GSK-3 and their

stimulation of GS activity ( $R^2=0.93$ ,  $p < 0.01$ ). This raises the possibility that GSK-3 may represent a potential molecular target of these compounds.

Altogether, the results of the present study confirm the high potential of *A. balsamea* to modulate hepatic glucose homeostasis in a way that can contribute to the Cree plant's ethnobotanical identification as helpful in the context of diabetes symptoms (Nachar, Vallerand et al. 2013).

Using solvents of varying polarity, we discovered that the greatest bioactivity lay in the hexane fraction. Further phytochemical fractionation and identification analyses further determined that AA, DAA and SQ are major pure compounds contained in *A. balsamea*. These compounds clearly appear to be responsible of the antidiabetic effect of the plant in hepatocytes by reducing G6Pase activity (diminishing hepatic glucose production) and stimulating GS activity (enhancing liver glucose storage). Our results also showed a strong correlation between the bioassays and the signaling pathways, implying that these compounds are working through both insulin-dependent and –independent pathways to exert their effect on G6Pase. In the case of GS, all compounds stimulated GSK-3 phosphorylation, thereby releasing the kinases's inhibition of GS. In all cases, compounds demonstrated a similar mechanism of action as the crude extract and hexane fraction. Despite the fact that the three compounds had beneficial antidiabetic effect in cultured hepatocytes, we conclude that DAA has the most promising profile; standing out with results close to its parent plant's crude extract. Although *in vivo* studies are needed to confirm their antidiabetic potential, *A. balsamea* compounds may serve as templates for novel antidiabetic therapeutic agents. More importantly, they will be useful to standardize or inform quality control approaches for



traditional Aboriginal preparations to be used in culturally adapted prevention and management strategies for Cree diabetics.

### **5-Author's contributions**

Abir Nachar performed all the experimental work, data analysis and wrote the paper.

Ammar Saleem, under Dr. John.T Arnason's supervision, carried out the phytochemical fractionation of *Abies balsamea*, the identification and the isolation of its constituents.

Dr. Pierre S. Haddad supervised A.N.'s work. He initiated the conceptual framework of the project, helped interpret the data and edited the manuscript.

### **6-Acknowledgements**

This work was supported by a Team Grant from the Canadian Institutes of Health Research (CIHR Team in Aboriginal Antidiabetic Medicines) to Pierre Selim Haddad, John Thor Arnason and Alain Cuerrier . It was conducted with the consent and support of the Cree Nation of Mistissini, of the Whapmagoostui First Nation, of the Cree Nation of Nemaska, of the Waskaganish First Nation and of the Cree Board of Health and Social Services of James Bay (Quebec, Canada). Very special thanks are due to the Elders and healers. They made this article possible by allowing us to use, for the purposes of this research, their knowledge relating to medicinal plants. Their trust has also enabled a useful exchange between Indigenous knowledge and Western science.

## 7-Tables

Table 1: Maximal non-toxic concentrations

Sample	Abbreviation used	Concentration in µg/mL
<i>Abies balsamea</i>	Abies	50
Aqueous fraction	H <sub>2</sub> O	25
Hexane fraction	Hexane	25
MeOH fraction	MeOH	25
EtOAc fraction	EtOAc	25
Peak 1	PK1	25
Peak 2	PK2	25
Peak 3	PK3	25
Peak 4	PK4	25
Peak 5	PK5	25
Peak 6	PK6	25
Peak 7	PK7	25
Peak 8	PK8	25
Abietic acid	AA	25
Dehydroabietic acid	DAA	25
Squalene	SQ	25

Maximal non-toxic concentrations of all samples used to treat H4IIE and HepG2 cells and determined by the LDH cytotoxicity assay.

Table 2: Compound identification.

Sample	Retention Time (min)	[M+H] <sup>+</sup>	MS/MS	Identification
PK1	12.7	411.7	178.1, 165.1	SQ
PK2	11.0	301.4	128.0, 115.1	DHA
PK3	11.3	301.5	115.1, 128.0	DHA derivative
PK4	09.4	485.2	109.2, 119.2, 469.2	Unknown
PK5	12.0	303.4	141.1, 115.0, 105.0	AA
PK6	12.7	357.2	-	Unknown
PK7	08.4	301.4	115.1, 128.0	DHA derivative
PK8	09.8	301.4	115.1	DHA derivative
Std1	11.0	301.4	128.0, 115.1	DHA
Std2	12.0	303.4	141.1, 115.0, 105.0	AA
Std3	12.7	411.7	178.1, 165.1	SQ

Identification of *A. balsamea* isolates by LC-MS/MS in positive electrospray ionization (see experimental section for details). Standards 1, 2 and 3 were injected applying same chromatographic and spectrometric conditions to confirm the identity.

## 8- Figure legends

Figure 1: Effect of *A. balsamea* and its solvent fractions on G6Pase (A) and GS (B) activity.

Results shown represent the change in G6Pase (A) and GS (B) activity observed after overnight treatment of H4IIE and HepG2 cells with the maximal non-toxic concentration of *A. balsamea* (50µg/mL) and the four fractions (25µg/mL). Results are expressed relative to DMSO (0.1%) vehicle control (A: 0% inhibition; B: 100 % activity). Insulin (100nM) was used as a positive control. \*:  $p < 0.05$ , \*\*:  $p < 0.01$  and \*\*\* :  $p < 0.001$  significantly different from DMSO (n=3 in triplicates).

Figure 2: Effect of the eight peaks isolated from the hexane fraction on the activity of G6Pase (A) and GS (B).

Results shown represent the change in G6Pase (A) and GS (B) activity observed after overnight treatment of H4IIE and HepG2 cells with the maximal non-toxic concentration of the eight peaks (20µg/mL). Results are expressed relative to DMSO (0.1%) vehicle control (A: 0% inhibition; B: 100 % activity). Insulin (100nM) was used as a positive control. \*:  $p < 0.05$ , \*\*:  $p < 0.01$  and \*\*\* :  $p < 0.001$  significantly different from DMSO (n=3 in triplicates).

Figure 3: Effect of Abietic acid (AA), Dehydroabietic acid (DAA) and Squalene (SQ), isolated from the active peaks, on the activity of G6Pase (A) and GS (B).

Results shown represent the change in G6Pase (A) and GS (B) activity observed after overnight treatment of H4IIE and HepG2 cells with the maximal non-toxic concentration of *A. balsamea* (50µg/mL), the hexane fraction (25µg/mL) and the three compounds (25µg/mL). Results are expressed relative to DMSO (0.1%) vehicle control (A: 0% inhibition; B: 100 % activity). Insulin (100nM) was used as a positive control. \*:  $p < 0.05$ , \*\*:  $p < 0.01$  and \*\*\* :  $p < 0.001$  significantly different from DMSO (n=3 in triplicates).

Figure 4: Effect of Abietic acid (AA), Dehydroabietic acid (DAA) and Squalene (SQ), isolated from the active peaks, on kinases regulating G6Pase activity Separately,

A) Phosphorylation of Akt. Phosphorylated (p-Akt) and total Akt were measured by Western blot in H4IIE cells treated with the maximal non-toxic concentration of the three compounds

(25µg/mL). B) Correlation between phosphorylation of Akt and the activity of G6Pase induced by *A.balsamea*, the hexane fraction and the pure compounds. Data was analyzed by linear regression analysis;  $R^2 = 0.92$ ,  $p < 0.05$ . C) Phosphorylation of AMPK. Phosphorylated (p-AMPK), total AMPK were measured by Western blot in H4IIE cells treated with the maximal non-toxic concentration of the three compounds (25µg/mL). D) Correlation between phosphorylation of AMPK and the activity of G6Pase induced by *A.balsamea*, the hexane fraction and the pure compounds. Data was analyzed by linear regression analysis;  $R^2 = 0.82$ ,  $p < 0.05$ . In panels A and C, ratios of p-Akt /total Akt and of p-AMPK/total AMPK were expressed as percentage relative to values obtained for DMSO (0.1%) vehicle controls. Insulin (100nM) and AICAR (2mM) were used as positive controls in A and C respectively. \*:  $p < 0.05$ , \*\*:  $p < 0.01$  and \*\*\*:  $p < 0.001$  Significantly different from DMSO (n=3 in triplicates). E) Immunoblot figures for p-Akt and total Akt. F) Immunoblot figures for p-AMPK and total AMPK.

Figure 5: Effect of Abietic acid (AA), Dehydroabietic acid (DAA) and Squalene (SQ), isolated from the active peaks, on GSK-3.

A) Phosphorylation of GSK-3. Phosphorylated (p-GSK-3) and total GSK-3 were measured by Western blot in HepG2 cells treated with the maximal non-toxic concentration of *A. balsamea* (50µg/mL), the hexane fraction (25µg/mL) and the three compounds (25µg/mL). The ratio of p-GSK-3 /total GSK-3 was expressed as percentage relative to values obtained for DMSO (0.1%) vehicle controls. Insulin (100nM) was used as positive controls. \*\*:  $p < 0.01$  and \*\*\*:  $p < 0.001$  significantly different from DMSO (n=3 in triplicates) . B) Correlation between GSK-3 phosphorylation and activation of GS induced by *A.balsamea*, the hexane fraction and the three compounds. Data was analyzed by linear regression analysis;  $R^2 = 0.96$ ,  $p < 0.01$ . C) Immunoblot figures for p-GSK-3 and total GSK-3.

## 9-Figures

Figure 1: Effect of *A. balsamea* and its solvent fractions on G6Pase (A) and GS (B) activity.

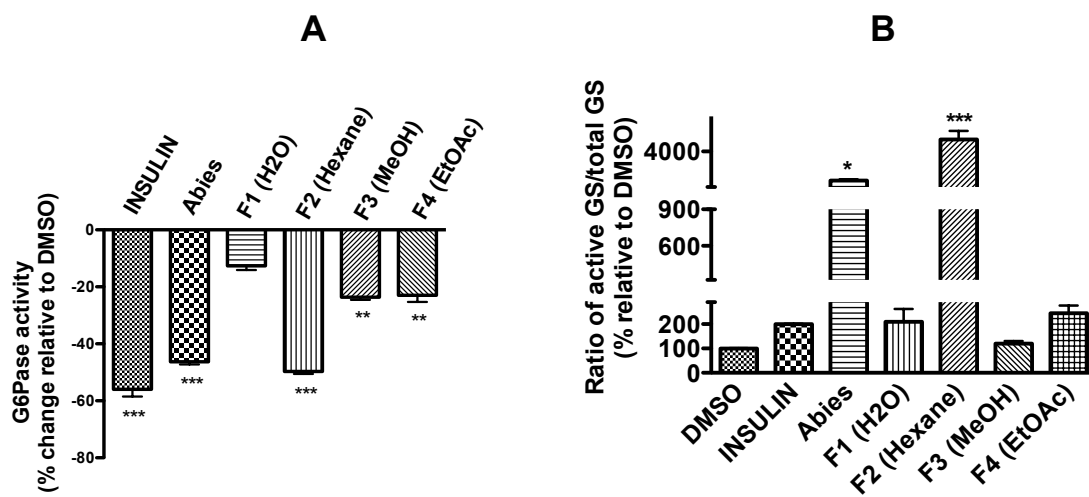


Figure 2: Effect of the eight peaks isolated from the hexane fraction on the activity of G6Pase (A) and GS (B).

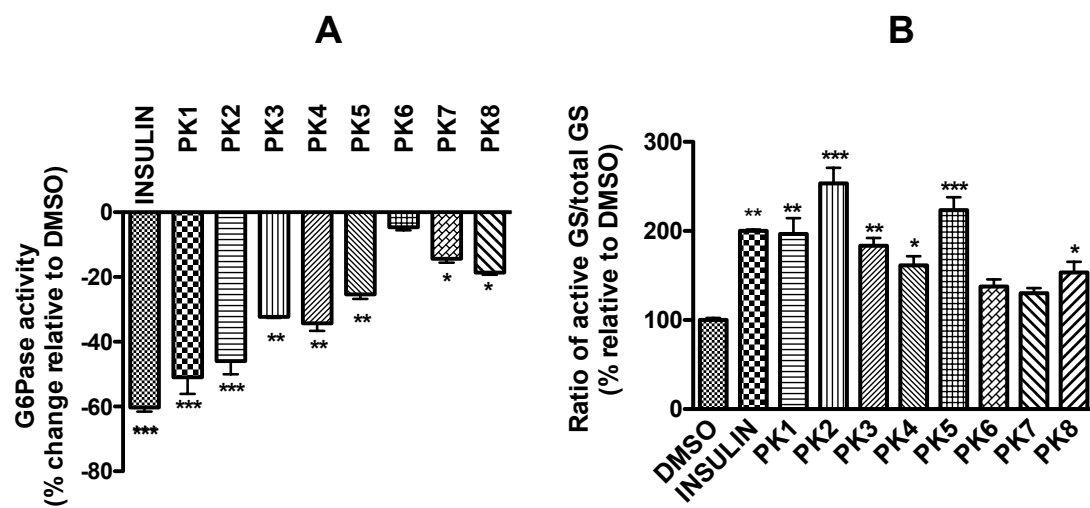


Figure 3: Effect of AA, DAA and SQ, isolated from the active peaks, on the activity of G6Pase (A) and GS (B).

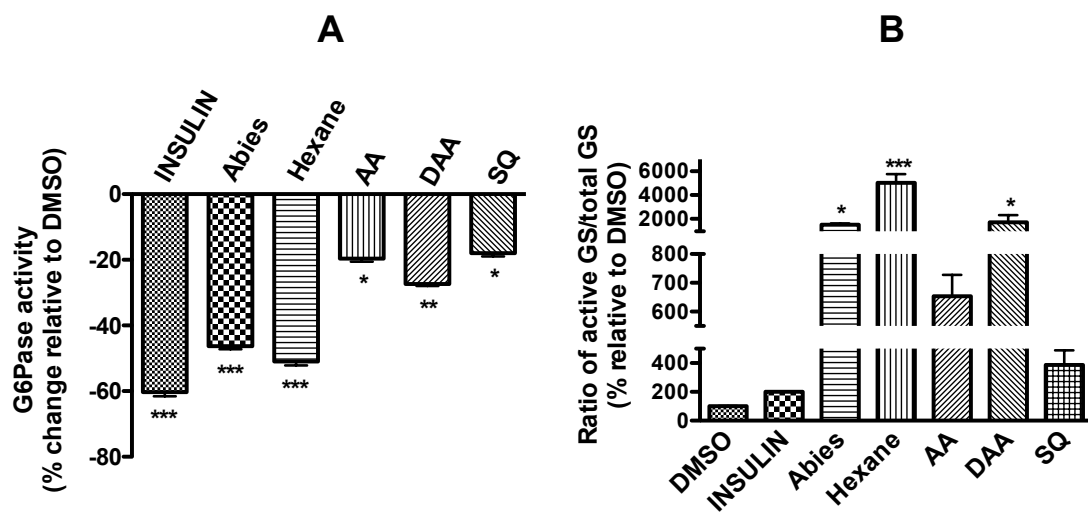
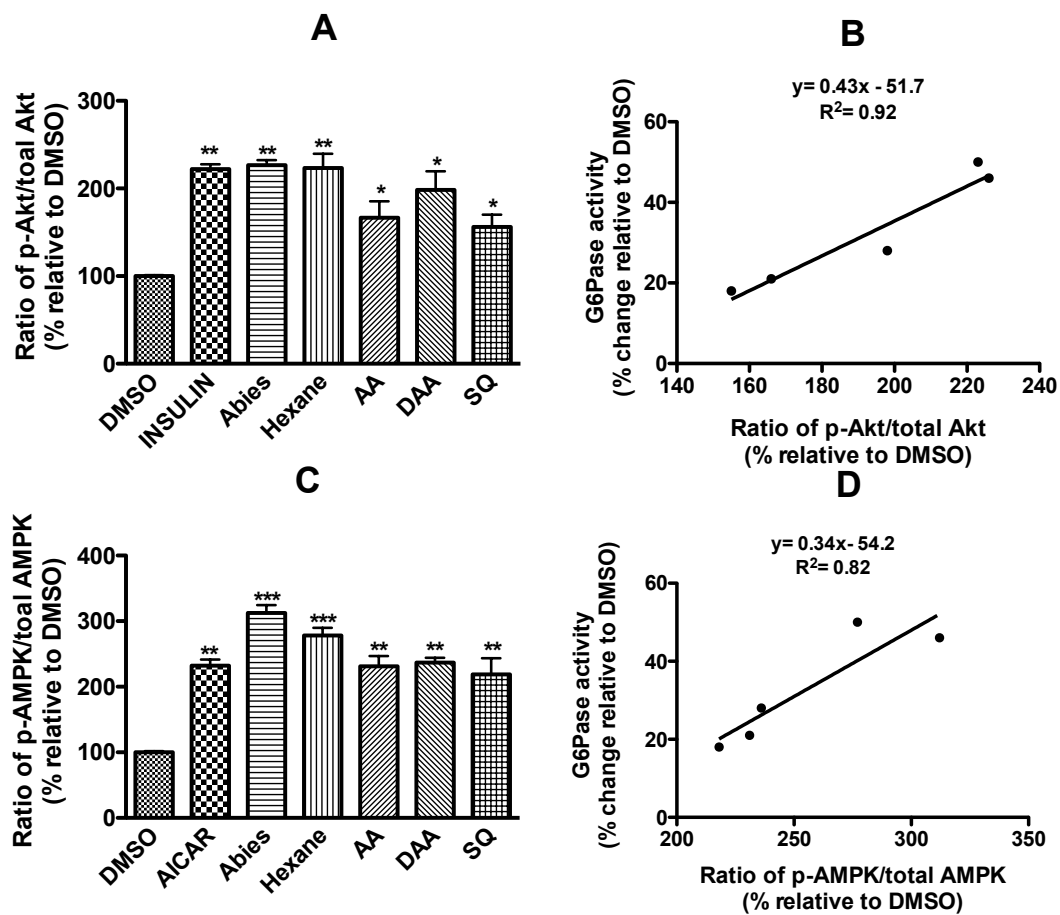




Figure 4: Effect of AA, DAA and SQ, isolated from the active peaks, on kinases regulating G6Pase activity



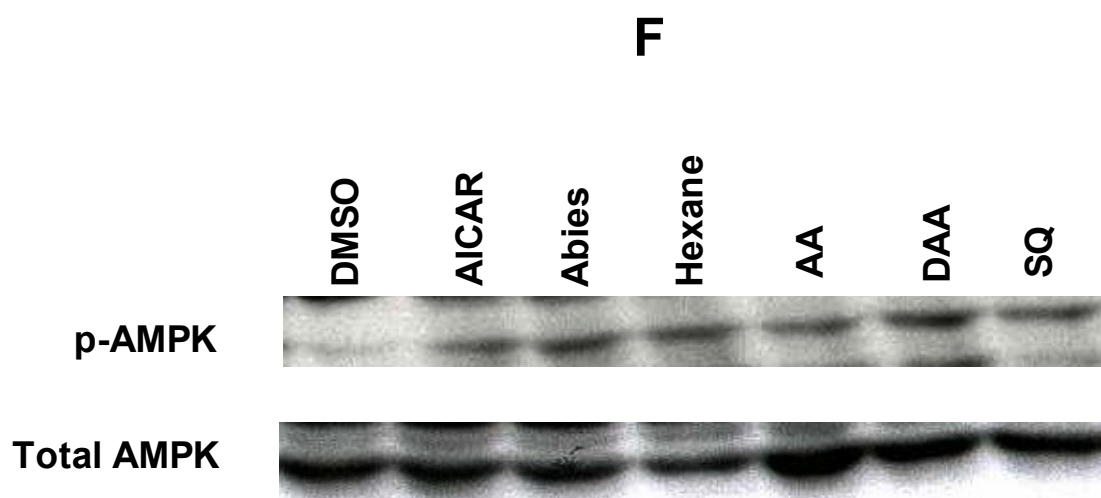
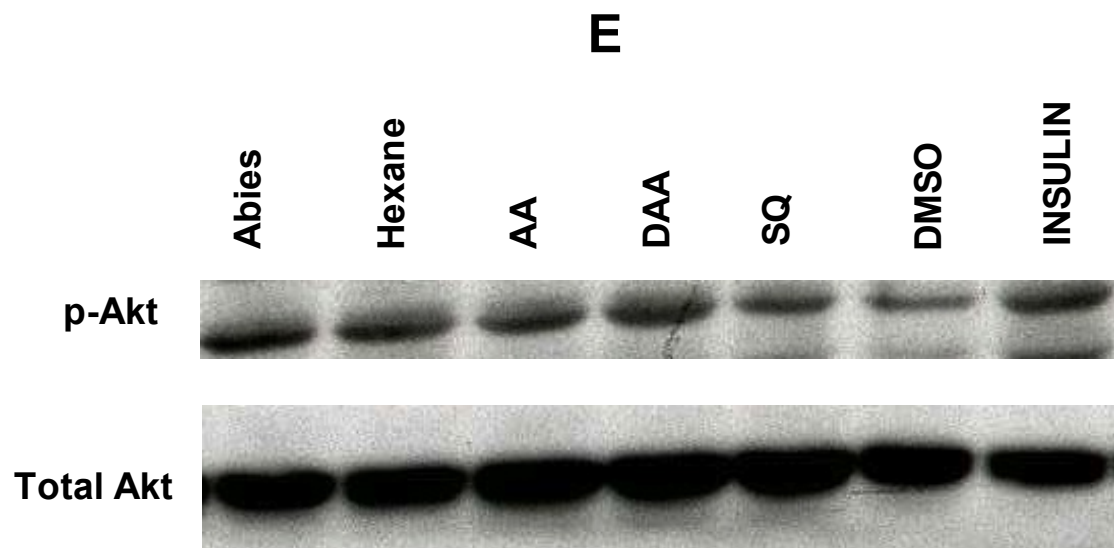
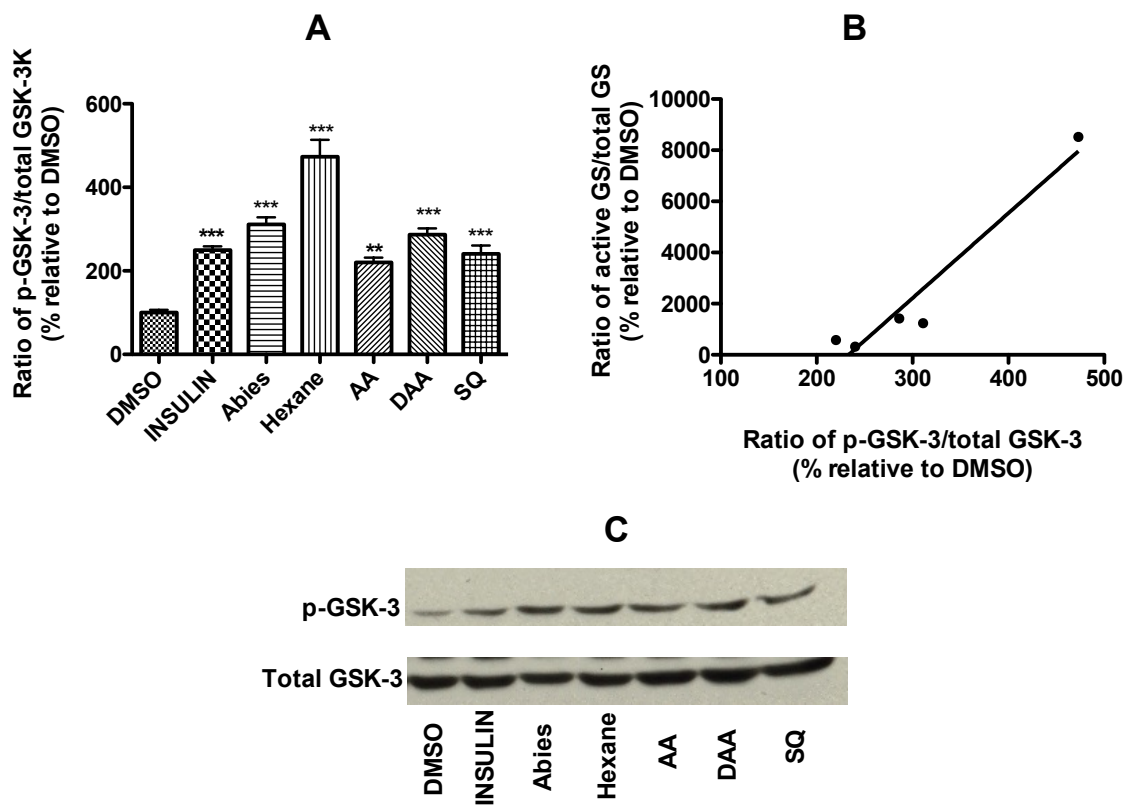


Figure 5: Effect of AA, DAA and SQ, isolated from the active peaks, on GSK-3.



## 10-References

1. Cheng, K.K., et al., *APPL1 potentiates insulin-mediated inhibition of hepatic glucose production and alleviates diabetes via Akt activation in mice*. Cell Metab, 2009. **9**(5): p. 417-27.
2. Pilkis, S.J. and D.K. Granner, *Molecular physiology of the regulation of hepatic gluconeogenesis and glycolysis*. Annu Rev Physiol, 1992. **54**: p. 885-909.
3. Yoon, J.C., et al., *Control of hepatic gluconeogenesis through the transcriptional coactivator PGC-1*. Nature, 2001. **413**(6852): p. 131-8.
4. Puigserver, P., et al., *Insulin-regulated hepatic gluconeogenesis through FOXO1-PGC-1alpha interaction*. Nature, 2003. **423**(6939): p. 550-5.
5. Wang, Y. and P.J. Roach, *Inactivation of rabbit muscle glycogen synthase by glycogen synthase kinase-3. Dominant role of the phosphorylation of Ser-640 (site-3a)*. J Biol Chem, 1993. **268**(32): p. 23876-80.
6. Brady, M.J., A.C. Nairn, and A.R. Saltiel, *The regulation of glycogen synthase by protein phosphatase 1 in 3T3-L1 adipocytes. Evidence for a potential role for DARPP-32 in insulin action*. J Biol Chem, 1997. **272**(47): p. 29698-703.
7. Cross, D.A., et al., *Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by insulin mediated by protein kinase B*. Nature, 1995. **378**(6559): p. 785-9.
8. Schmoll, D., et al., *Regulation of glucose-6-phosphatase gene expression by protein kinase Balpha and the forkhead transcription factor FKHR. Evidence for insulin response unit-dependent and -independent effects of insulin on promoter activity*. J Biol Chem, 2000. **275**(46): p. 36324-33.
9. Towler, M.C. and D.G. Hardie, *AMP-activated protein kinase in metabolic control and insulin signaling*. Circ Res, 2007. **100**(3): p. 328-41.
10. Viollet, B., et al., *Targeting AMP-activated protein kinase as a novel therapeutic approach for the treatment of metabolic disorders*. Diabetes Metab, 2007. **33**(6): p. 395-402.
11. IDF, *IDF Diabetes Atlas sixth edition*, T.N. Leonor Guariguata, Jessica Beagley, Ute Linnenkamp, Olivier Jacqmain, Editor 2013.

12. Ekoe, J.M., et al., *Epidemiology of obesity in relationship to some chronic medical conditions among Inuit and Cree Indian populations in New Quebec, Canada*. Diabetes Res Clin Pract, 1990. **10 Suppl 1**: p. S17-27.
13. Hegele, R.A., *Genes, environment and diabetes in Canadian aboriginal communities*. Adv Exp Med Biol, 2001. **498**: p. 11-20.
14. Nachar, A., et al., *The action of antidiabetic plants of the canadian james bay cree traditional pharmacopeia on key enzymes of hepatic glucose homeostasis*. Evid Based Complement Alternat Med, 2013. **2013**: p. 189819.
15. Spoor, D.C., et al., *Selected plant species from the Cree pharmacopoeia of northern Quebec possess anti-diabetic potential*. Can J Physiol Pharmacol, 2006. **84**(8-9): p. 847-58.
16. Thomas, J.A., K.K. Schlender, and J. Larner, *A rapid filter paper assay for UDPglucose-glycogen glucosyltransferase, including an improved biosynthesis of UDP-14C-glucose*. Anal Biochem, 1968. **25**(1): p. 486-99.
17. Saleem, A., et al., *A RP-HPLC-DAD-APCI/MSD method for the characterisation of medicinal Ericaceae used by the Eeyou Istchee Cree First Nations*. Phytochem Anal, 2010. **21**(4): p. 328-39.
18. Hall, D.E., et al., *Evolution of conifer diterpene synthases: diterpene resin acid biosynthesis in lodgepole pine and jack pine involves monofunctional and bifunctional diterpene synthases*. Plant Physiol, 2013. **161**(2): p. 600-16.
19. Guerrero-Analco, J.A., et al., *Bioassay-guided isolation of the antidiabetic principle from Sorbus decora (Rosaceae) used traditionally by the Eeyou Istchee Cree First Nations*. J Nat Prod, 2010. **73**(9): p. 1519-23.
20. WHO, *Global status report on noncommunicable diseases 2010*, 2011: Geneva.
21. Hutton, J.C. and R.M. O'Brien, *Glucose-6-phosphatase catalytic subunit gene family*. J Biol Chem, 2009. **284**(43): p. 29241-5.
22. Van Wauwe, J. and B. Haefner, *Glycogen synthase kinase-3 as drug target: from wallflower to center of attention*. Drug News Perspect, 2003. **16**(9): p. 557-65.
23. He, L., et al., *Metformin and insulin suppress hepatic gluconeogenesis through phosphorylation of CREB binding protein*. Cell, 2009. **137**(4): p. 635-46.

24. Fernandez, M.A., et al., *Anti-inflammatory activity of abietic acid, a diterpene isolated from Pimenta racemosa var. grisea*. J Pharm Pharmacol, 2001. **53**(6): p. 867-72.
25. Takahashi, N., et al., *Abietic acid activates peroxisome proliferator-activated receptor-gamma (PPARgamma) in RAW264.7 macrophages and 3T3-L1 adipocytes to regulate gene expression involved in inflammation and lipid metabolism*. FEBS Lett, 2003. **550**(1-3): p. 190-4.
26. Ulusu, N.N., et al., *Abietic acid inhibits lipoxygenase activity*. Phytother Res, 2002. **16**(1): p. 88-90.
27. Hwang, K.H., et al., *Abietic acid has an anti-obesity effect in mice fed a high-fat diet*. J Med Food, 2011. **14**(9): p. 1052-6.
28. Kang, M.S., et al., *Dehydroabietic acid, a phytochemical, acts as ligand for PPARs in macrophages and adipocytes to regulate inflammation*. Biochem Biophys Res Commun, 2008. **369**(2): p. 333-8.
29. Takahashi, N., et al., *Dehydroabietic acid activates peroxisome proliferator-activated receptor-gamma and stimulates insulin-dependent glucose uptake into 3T3-L1 adipocytes*. Biofactors, 2011. **37**(4): p. 309-14.
30. Kang, M.S., et al., *Dehydroabietic acid, a diterpene, improves diabetes and hyperlipidemia in obese diabetic KK-Ay mice*. Biofactors, 2009. **35**(5): p. 442-8.
31. Saint-Leger, D., et al., *A possible role for squalene in the pathogenesis of acne. I. In vitro study of squalene oxidation*. Br J Dermatol, 1986. **114**(5): p. 535-42.
32. Newmark, H.L., *Squalene, olive oil, and cancer risk: a review and hypothesis*. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 1997. **6**(12): p. 1101-3.
33. Reddy, L.H. and P. Couvreur, *Squalene: A natural triterpene for use in disease management and therapy*. Adv Drug Deliv Rev, 2009. **61**(15): p. 1412-26.

## **Chapitre 4. Article 3**

# **Phenolic compounds isolated from fermented blueberry juice decrease hepatic glucose output and enhance glucose uptake**

### **Auteurs**

Abir Nachar <sup>1,2</sup>, Melinda Vinqvist <sup>3</sup>, Tri Vuong <sup>4</sup>, Wilhelmina Kalt <sup>3</sup>, Chantal Matar <sup>4</sup>, Pierre S. Haddad<sup>1,2</sup>

### **Affiliations**

<sup>1</sup> Natural Health Products and Metabolic Diseases Laboratory, Dept. of Pharmacology, Université de Montréal, Montreal, QC, Canada

<sup>2</sup> Canadian Institutes of Health Research Team in Aboriginal Antidiabetic Medicines and Montreal Diabetes Research Center, Canada

<sup>3</sup> Food chemistry, Agriculture and Agri-Food Canada, Government of Canada.

<sup>4</sup> Department of Nutritional Sciences, Faculty of Health Sciences, University of Ottawa, Ottawa, Canada.

## Abstract

Liver and muscle play an essential role in glucose homeostasis. Glucose-6-phosphatase (G6Pase) and glycogen synthase (GS) are rate limiting enzymes in gluconeogenesis and glycogenogenesis pathway respectively in the liver. Recent studies reported that fermentation of blueberry juice (*Vaccinium angustifolium*.Ait; FJ) by *Serratia vaccinii* bacterium confers it strong antidiabetic potential both *in vivo* and *in vitro*. The purpose of this project is to elucidate the effect of FJ on glucose homeostasis in liver and muscle cells and to identify active fractions/principles responsible of this effect.

FJ was fractionated using standard chromatography procedures. Confluent hepatic cell lines (H4IIE, HepG2) and muscle cell line (C2C12) were treated with optimal non-toxic concentrations of FJ, fractions and compounds thereof. G6Pase and GS activities were measured using the glucose oxidase method and a radioactive assay, respectively. Specific uptake of radioactive 2-Deoxy-D-glucose into C2C12 was measured using a scintillation counter.

Seven polyphenolic fractions were obtained from FJ fractionation. FJ and its phenolic fractions Phe, Early #1 and Early #2 inhibited G6Pase by 31%, 45%, 51% and 26%, activated GS by 2.3-, 2.3-, 2.2- and 2-fold, and stimulated glucose uptake by 19%, 25%, 18% and 15% respectively, as compared to DMSO vehicle control. Further analysis of the active fractions yielded 4 compounds; catechol (45.5 $\mu$ M) decreased G6Pase activity by 54%, increased GS by 2-fold and stimulated glucose uptake by 44%.

FJ antidiabetic activity involves modulation of glucose homeostasis in the liver and the muscle. Bioassay-guided fractionation identified catechol as a potential active compound, which will help standardize FJ.

**Keys words:** Fermented blueberry juice, diabetes, hepatic glucose output, glucose uptake, *chlorogenic acid*, *gallic acid*, *protocatechuic acid*, *catechol*.



Cet article va être soumis dans le journal Diabetologia.

## **Contribution de chaque co-auteur**

J'ai effectué tous les travaux expérimentaux, l'analyse des données ainsi que la rédaction de l'article.

Melinda Vinqvist, sous la supervision de Dr Wilhelmina Kalt, a effectué le fractionnement phytochimique du jus de bleuet fermenté, l'identification et l'isolement de ses constituants.

Tri Vuong, sous la supervision de Dr Chantal Matar, a préparé le jus de bleuet normal et fermenté.

Dr Pierre S. Haddad est mon directeur de recherche qui m'a supervisé tout le long de ma période d'études. Il a initié le cadre conceptuel du projet, aidé dans l'interprétation des données et corrigé l'article.

**Abbreviations**

AMPK: AMP- activated protein kinase

Antho: Anthocyanins fraction

CA: *Chlorogenic acid*

Cat: *Catechol*

CJ: Control blueberry juice

FJ: Fermented blueberry juice

G6Pase: Glucose-6-Phosphatase

Flv: Flavonoid fraction

GA: *Gallic acid*

GLUT4: Glucose transporters 4

GS: Glycogen Synthase

GSK-3: Glycogen Synthase kinase-3

Hetero: Heteropolymers fraction

IRS: Insulin Receptor Substrate

PA: *Protocatechuic acid*

PAC: Proanthocyanidins fraction

Phe: Phenolic fraction

PGC-1alpha: Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha

## 1- Introduction

Type 2 diabetes is a chronic disease that affects 382 million people worldwide and is associated with many complications, especially cardiovascular diseases (IDF 2013). Insulin resistance plays a major role in the physiopathology of type 2 diabetes. It is associated with impaired insulin stimulation of glucose transport in muscle and fat as well as impaired suppression of hepatic glucose production (Weyer, Hanson et al. 2000). Nowadays, several people are using natural health products alone or in combination with their hypoglycemic drugs to help manage type 2 diabetes. More than one third of Canadian diabetic patients are using alternative medicine (McFarland, Bigelow et al. 2002; Nahas and Moher 2009).

Members of the *Vaccinium* genus including *Vaccinium angustifolium*. Ait (Canadian lowbush blueberry) are well known to have anti-diabetic activity and have been used in the traditional medicine of many populations to treat diabetic symptoms (Haddad, Depot et al. 2001; Chambers and Camire 2003). Recent studies have shown that different parts of the *V. angustifolium* plant possess insulin-like, glitazone-like and cytoprotective effect (Martineau, Couture et al. 2006). Blueberry fruit contains many phenolic compounds (Manach, Scalbert et al. 2004; Harris, Burt et al. 2007). It has been shown that biotransformation of blueberry juice by a bacteria called *Serratia vaccinii* greatly increases the juice's content in phenolic compounds and its antioxidant activity (Martin 2005). This biotransformation also has an impact on the anti-diabetic potential of blueberry juice. Indeed, fermented blueberry juice (FJ), in contrast to normal juice, stimulated glucose uptake in muscle cells and adipocytes using an insulin-independent pathway implicating the phosphorylation of AMP-activated protein kinase (AMPK) (Vuong, Martineau et al. 2007). This antidiabetic effect was validated in an animal model using KK-Ay hyperphagic mice (Vuong, Benhaddou-Andaloussi et al. 2009).

Glucose homeostasis results from equilibrium between the intestinal absorption of glucose, its production by the liver and its utilization by peripheral tissues like muscles and fat (Beardsall, Diderholm et al. 2008). Insulin regulates hepatic glucose production and storage. It inhibits some transcription factors like the forkhead family and the Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator-1 $\alpha$  (PGC-1 $\alpha$ ) leading to a decrease in the activity of glucose-6-phosphatase (G6Pase), a key enzyme implicated in hepatic glucose production (Schmoll, Walker et al. 2000; Puigserver, Rhee et al. 2003). On the other hand, insulin phosphorylates glycogen synthase kinase-3 (GSK-3) leading to the activation of glycogen synthase (GS), a key enzyme implicated in glucose storage (Wang and Roach 1993). In addition, it regulates glucose uptake and utilization in muscle through the stimulation of glucose transporter 4 (Glut4) translocation to the plasma membrane in order to mediate facilitative glucose diffusion (Pessin, Thurmond et al. 1999).

In continuity with aforementioned studies on FJ in muscle cells and adipocytes, the aim of this project is to elucidate the anti-diabetic effect of FJ in cultured hepatocytes and muscle cells. More specifically, our aim is to isolate active fractions and compounds responsible of the anti-diabetic activity of FJ using a bioassay-guided fractionation approach.

## **2-Material and Methods**

### **2.1-Cell culture**

All the cell lines used – H4IIE (rat hepatoma), HepG2 (human hepatoma) and C2C12 (murine skeletal myoblasts) – were purchased from American Type Culture Collection (ATCC; Manassas, VA). H4IIE cells were grown in a high glucose Dubelcco's Modified Eagle Medium (DMEM) containing 10% Fetal Bovin Serum (FBS) and 0.5% antibiotics (PS: Penicillin 100 U/mL, Streptomycin 100 µg/mL); HepG2 cells in DMEM/F12 (50/50) medium, containing 10% FBS and 0.5% PS; and C2C12 myocytes in DMEM medium containing 10% FBS, 10% HS and 0.5% PS. All cells were cultured and incubated at 37°C with 5% CO<sub>2</sub> in 12-well plates for glucose uptake and G6Pase experiments and in 6-well plates for GS experiments. For glucose uptake experiments, myoblasts were differentiated into myotubes over a 7-day period; overnight treatment (16-18h) with the different samples beginning on day 6 of differentiation.

### **2.2- Preparation of fermented blueberry juice**

Mature lowbush blueberries (*Vaccinium angustifolium*.Ait) were purchased from Cherryfield Foods Inc. (Cherryfield, Maine, USA) as fresh and untreated fruits. Blueberry juice was extracted by blending the fruit (100g) with an equivalent quantity (100g) of Minimal Broth Davis without dextrose (MM) (Difco Laboratories, Detroit, MI, USA). The fruit mixture was then centrifuged to remove insoluble particles. The resulting juice was sterilized using 0.22 µm Express Millipore filters (Millipore, Etobicoke, Ontario, Canada).

*Serratia vaccinii* bacteria were cultured as previously described (Martin 2005). The juice was inoculated with a saturated culture of *Serratia* corresponding to 2% of the total juice volume. After a 4-d fermentation period, the biotransformed juice was sterilized by 0.22µm filtration. Blueberry and fermented blueberry juice have been partially characterized elsewhere (Martin 2005; Matchett, MacKinnon et al. 2006; Vuong, Martineau et al. 2007; Vuong, Benhaddou-Andaloussi et al. 2009; Vuong, Matar et al. 2010).

### **2.3- Bioassay-guided fractionation of fermented blueberry juice and compound identification**

Organic solvents were purchased from Fisher Scientific Canada. Preparation of blueberry fractions was a multi-step process. The starting material for the fractionation process was either blueberry juice prepared from wild blueberries (*Vaccinium angustifolium*.Ait), which was the Control Juice (CJ), or else was the product of fermentation of the Control Juice with *Serratia vaccinii*, called the Fermented Juice (FJ). In step one of the fractionation process, either the Control Juice or the Fermented Juice was loaded in batches of approximately 500ml onto 29.5 cm x 5 cm chromatography columns (pre-conditioned with 1 column volume methanol then 2 column volumes water) containing Waters preparative C18 resin (125Å, 55-105µ) then washed with 2 column volumes of water, which was sufficient to remove sugars and organic acids (discarded). The phenolic compounds were eluted from the column using 1.2 column volumes of 13mM trifluoroacetic acid (Sigma Aldrich, ON, Canada) in ethanol. The ethanol eluent was dried using rotary evaporation and lyophilisation and was called the Phenolic fraction (Phe). The Control Juice underwent no further fractionation after this initial step. In step two, a portion of the Phe fraction from the FJ was dissolved in water and reapplied to the reconditioned (as

outlined above) C18 column. Early eluting small phenolic compounds (fraction Early #1) were eluted using 4 column volumes of 0.16M HCl (Ricca Chemical Company, Texas) and 2.06M ethanol in water. This fraction was quite rich in *gallic acid*, *protocatechuic acid*, and *catechol*, as confirmed by HPLC (comparing retention times and UV-Vis profiles of the peaks to standards). The next fraction (fraction Early #2) was eluted using an additional 2 column volumes of 0.16M HCl and 2.06M ethanol in water and was rich in *chlorogenic acid* (as confirmed by HPLC). The remaining bound materials, mainly flavonoids, were eluted using 0.16M HCl and 13.7M ethanol in water and called the flavonoid fraction (Flv). The three fractions were dried using rotary evaporation and lyophilisation. In step three, a portion of the FJ Flv fraction was dissolved in 4.28M ethanol and applied to a 34.5 cm x 5 cm column of Sigma-Aldrich lipophilic Sephadex (LH-20, 25-100 $\mu$ ). Solvent conditions were varied to remove HCl and elute three fractions. A fraction enriched in anthocyanins (Antho) was eluted using 7 column volumes of 4.28M ethanol. A fraction enriched in heteropolymers (Hetero) was then eluted using 3 column volumes of 8.56M ethanol. Finally, a fraction enriched in proanthocyanidins (PAC) was eluted using 3 column volumes of 9.53M acetone. All three fractions were dried using rotary evaporation and lyophilisation.

#### **2.4- Cytotoxicity assay (LDH)**

The cytotoxicity assay was based on a lactate dehydrogenase (LDH) release kit (LDH Colorimetric Kit; Roche, Mannheim, Germany) and served to determine optimal non-toxic concentration of each sample in H4IIE, HepG2 and C2C12 cells. As was described previously (Nachar, Vallerand et al. 2013), the cells were treated overnight (16-18h) with control blueberry juice (CJ), fermented (FJ) blueberry juice, fractions thereof, or pure compounds at

different concentrations. The culture media were collected separately for each condition and kept on ice (representing released LDH from cells). Then the cells were lysed by adding culture medium with 1% triton, for 10 minutes at 37°C, 5% CO<sub>2</sub> (representing cellular LDH). All the samples were centrifuged at 250xg, 4°C for 10 minutes and kept on ice in Eppendorf tubes. The ratio of released LDH to total LDH (total LDH= released LDH+ cellular LDH) was calculated for each condition and results normalized to the values obtained from cells treated with the vehicle control (DMSO 0.1%). Optimal non-toxic concentrations for each sample were the highest ones that still yielded LDH release comparable to that of DMSO controls.

## **2.5- Hepatic glucose production**

H4IIE cell line was used to measure the activity of Glucose-6-phosphatase. Confluent cells were treated overnight (16-18h) with DMSO 0.1% (vehicle control), insulin 100 nM (positive control), control blueberry juice (CJ), fermented blueberry juice (FJ), each of the seven fractions or each of the four pure compounds, all at their optimal non-toxic concentration. After the treatment, cells were rinsed then lysed using a 15 mM Phosphate buffer containing 0.05% Triton and 1.3 mM Phenol (pH = 6.5). A glucose-6-phosphate-containing buffer (200 mM) was then added to the cell lysates for 40 min at 37°C; G-6-P contained in this buffer served as a substrate for endogenous Glucose-6-phosphatase to yield glucose. Wako AutoKit Glucose colorimetric assay (Wako Chemicals USA Inc, Richmond, VA) was used to determine the quantity of glucose generated in this reaction according to manufacturers' recommendations. BCA method was used to determine the protein content for each condition. Results were expressed relative to vehicle control (DMSO 0.1%).



## **2.6- Glycogen Synthase activity**

HepG2 cells were used in this assay since this cell line exhibit a better expression of the GS enzyme compared to the H4IIE hepatocytes (Thomas, Schlender et al. 1968). After achieving confluence in 6 well plates, the cells were treated overnight (16-18h) with vehicle control (DMSO 0.1%), Control blueberry juice (CJ), fermented blueberry juice (FJ), each of the seven fractions or each of the four pure compounds, all at their optimal non-toxic concentrations. Treatment with insulin at 100nM for 15 minutes was used as a positive control in this assay. After treatment, cells were washed then lysed in a buffer solution containing 50 mM glycylglycine, 100 mM sodium fluoride, 20 mM EDTA, 0.5% glycogen, pH 7.4 and a complete protease inhibitor cocktail added just before the assay. The lysates were centrifuged at 1000xg for 20 minutes at 4°C. After centrifugation, 30 uL of supernatant from each condition were added to 100 uL of a specific buffer solution to measure active GS (25 mM glycylglycine, 0.275 mM UDP-glucose, 0.12 uCi/mL U-<sup>14</sup>C UDP-glucose, 1% glycogen, 1 mM EDTA, 10 mM sodium sulfate, pH 7.5) and another 30 uL of supernatant were added to 100 uL of a specific buffer solution to measure total GS (25 mM Tris, 5 mM UDP-glucose, 0.12 uCi/mL U-<sup>14</sup>C UDP-glucose, 1% glycogen, 3 mM EDTA, 5 mM glucose-6-phosphate, pH 7.9). The tubes were incubated in a water bath at 30°C for 120 minutes. After incubation, 90 uL of the mix for each condition was transferred on Watman 31 ET chr 2 cm<sup>2</sup> paper. The papers were rinsed with cold ethanol (4°C) for 30 minutes than 2 times with ethanol 66% at room temperature for 30 minutes. After removing the ethanol, the papers were covered with acetone for 2-3 minutes. Once they were dried the papers were transferred into scintillation

vials. The resulted radioactivity was counted with a specific protocol for  $^{14}\text{C}$  using a  $\beta$ -counter (LKB Wallac 1219; Perkin Elmer, Woodbridge, Ont., Canada).

## **2.7- Glucose uptake bioassay**

Myocytes were grown in 12-well plates to 60% confluence then differentiated into myotubes over a 7-day period. On day 6 of differentiation, C2C12 were treated overnight (16-18h) with DMSO (0.1%) vehicle control, control juice (CJ), fermented blueberry juice (FJ), each of the seven fractions or each the four pure compounds. all at their optimal non-toxic concentration. Metformin (400 $\mu\text{M}$ ) was used as a positive control in similar conditions. After treatment, cells were rinsed twice with a warm Krebs phosphate buffer (KPB: 20mM Hepes, 4.05mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 0.95mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 136mM NaCl, 5mM glucose, 4.7mM KCl, 1mM  $\text{CaCl}_2$ , 1mM  $\text{MgSO}_4$ , pH 7.4) then incubated with KPB for 30 min at 37°C. At this point, insulin (100nM) was added to specific wells to act as another positive control (incubation in KPB buffer for 30 min). Cells were then rinsed twice with warm glucose-free KPB, then incubated in glucose-free KPB containing 0.5 $\mu\text{Ci/mL}$  2-deoxy-D- $^3\text{H}$ -glucose (TRK-383, Amersham Biosciences, Baie d'urfé, Canada) for 10 min at 37°C. After incubation, cells were kept on ice and rinsed 3 times with ice-cold glucose-free KPB then lysed in 0.5 $\mu\text{L}$  of NaOH (0.1M) for 30 min. The lysates were transferred with 1 mL of water to scintillation vials, then 4 mL of liquid scintillation cocktail (Beckman Coulter, Fullerton, USA) was added to each vial and incorporated radioactivity was measured with a specific protocol for  $^3\text{H}$  using a  $\beta$ -counter (LKB Wallac 1219; Perkin Elmer, Woodbridge, Ont., Canada).

## **2.8- Statistical analysis**

All data were reported as the mean  $\pm$  SEM of 3 different experiments with triplicates for each sample. Results were analyzed by one-way analysis of variance (ANOVA) and Dunnett post-

test using StatView software (SAS Institute Inc., Cary, NC). A *p* value below 0.05 was considered statistically significant.

### **3- Results**

#### **3.1- Cytotoxicity assay (LDH)**

After overnight treatment of H4IIE, HepG2 and differentiated C2C12 cells with CJ, FJ, each of the seven fractions or each of the four pure compounds at different concentrations, LDH released and total LDH were measured for each condition. Table 1 shows the optimal non-toxic concentration chosen for each sample and cell line based on the results of LDH test.

#### **3.2- All fractions derived from FJ decrease G6Pase activity and increase GS activation**

Fermented blueberry juice (FJ) showed a significant effect on G6Pase activity (31% reduction), which is almost half of insulin's effect (67% decrease). The control juice (CJ) did not induce a significant decrease in the activity of G6Pase. After fractionation of FJ, the seven fractions were tested in the G6Pase bioassay and all of them showed varied yet statistically significant inhibitory effect on the enzyme's activity that ranged from 20% to 61% when compared to the vehicle control (DMSO 0.1%; 0% inhibition reference; Figure 1A).

In terms of GS activity, FJ showed a significant increase in the enzyme's activity (2.3 fold increase) identical to that of the positive control, insulin (2.3 fold activation). As observed with G6Pase activity, CJ was without any significant effect and showed results similar to the vehicle control. All seven fractions derived from FJ were able to significantly increase the activity of GS at different levels that ranged from 1.9- to 2.7-fold when compared to the vehicle control (DMSO 0.1%; 100% activation; Figure 1B).

#### **3.3- Phenolic fractions enhance glucose uptake in C2C12 muscle cells**

When tested for their ability to enhance glucose uptake in C2C12 muscle cells, insulin and

metformin, used as positive controls, stimulated glucose transport into cells by 33% and 40% respectively. FJ showed 20% stimulation of this uptake whereas CJ was without any effect (similar to vehicle control, DMSO). The phenolic fraction (Phe) along with its Early #1 and Early #2 subfractions were able to enhance glucose uptake into muscle cells by 25%, 18% and 15% respectively. The other fractions were without effect in this bioassay when compared to vehicle control (DMSO 0.1%; 100% activation; figure 2).

### **3.4- Identification and isolation of phenolic compounds from the active fractions**

Results of G6Pase and GS activity as well as glucose uptake bioassays were used to guide identification and isolation of compounds found in the active fractions. According to the HPLC, we confirmed that the three fractions Phe, Early #1 and Early #2 contained mainly four phenolic compounds: *Chlorogenic acid* (CA), *Gallic acid* (GA), *Protocatechuic acid* (PA) and *catechol* (Cat) (comparing retention times and UV-Vis profiles of each peak to respective standards).

### **3.5- Identification of GA and Cat as the most active compounds acting on key enzymes implicated in hepatic glucose output**

As mentioned above, the most active fractions (Phe, Early #1 and Early #2) were rich in phenolic compounds mainly CA, GA, PA and Cat. These compounds were tested in the G6Pase and the GS assays. Two compounds, CA and PA, had almost the same effect on G6Pase activity (11% decrease). GA was able to reduce the enzyme activity by 25% and interestingly Cat was the most active compound with a 54% decrease in G6Pase activity compared to the vehicle control DMSO (0.1%) (Figure 3A). According to the GS assay, the four compounds were able to increase significantly the activity of the enzyme by almost 2 fold compared to DMSO (0.1%) vehicle control (Figure 3B).

### **3.6- Enhancement of glucose uptake by CA, GA and Cat**

Along with their ability to regulate key enzymes implicated in hepatic glucose output, CA, GA and Cat showed ability to enhance glucose uptake in C2C12 cells by 15%, 16% and 43% respectively. In contrast, PA had no effect when compared to the vehicle control DMSO (0.1%) (Figure 4).

#### 4- Discussion

Insulin resistance is a risk factor leading to the development of type 2 diabetes (Silfen, Manibo et al. 2001). Along with the decrease in the phosphorylation of Insulin Receptor Substrates (IRS-1 and IRS-2) and the activity of PI3-K, translocation of glucose transporters and activity of key enzymes implicated in glucose homeostasis are also reduced (Pessin and Saltiel 2000). Despite the presence of many hypoglycemic drugs in the market, the control of glycaemia is sometimes hard to achieve and populations in Canada and the USA are using natural health products alone or in combination with their oral hypoglycemic in order to manage diabetes (McFarland, Bigelow et al. 2002; Nahas and Moher 2009).

Several parts of the Canadian “lowbush blueberry” (*Vaccinium Angustifolium*.Ait) plant was shown by our group to exert antidiabetic activities (Martineau, Couture et al. 2006). Meanwhile, Matar and colleagues demonstrated that biotransformation of blueberry juice by the *Serratia vaccinii* bacteria conferred a new phytochemical profile and biological activity to the juice (Martin 2005). Indeed, fermented blueberry juice (FJ) has an increase phenolic content with more pronounced antioxidant activities compared to the normal juice (CJ) (Martin 2005; Vuong, Martineau et al. 2007; Vuong, Benhaddou-Andaloussi et al. 2009). We then combined our efforts to examine the impact of fermentation on anti-diabetic potential. We found that fermentation conferred to blueberry juice the capacity to enhance glucose uptake in muscle cells and adipocytes via phosphorylation of AMPK (Vuong, Martineau et al. 2007). Since the regulation of hepatic glucose output and glucose utilization by peripheral tissues like muscle and fat is a key regulator of glycaemia (Cross, Alessi et al. 1995; Roach 2002; Mues, Zhou et al. 2009), we chose to further evaluate the effect of FJ on glucose

transport into muscle cells and key enzymes implicated in the hepatic glucose output. Notably, we also sought to isolate active fractions/compounds participating in the anti-diabetic activity of the FJ using a bioassay-guided fractionation approach.

In order to evaluate the effect of FJ and its fractions on hepatic glucose output, we chose to test their effect on rate-limiting enzyme of gluconeogenesis (G6Pase, (Schmoll, Walker et al. 2000)), and glycogen synthesis (GS, (Wang and Roach 1993)). We also evaluated the effect of FJ and its fractions on glucose uptake in cultured C2C12 cells in order to better delineate constituents involved in the anti-diabetic activity on muscle.

Initially, we carried out a fractionation of FJ in a multi-step process using chromatographic columns and different solvents. This yielded seven polyphenolic fractions, which were tested in the G6Pase, GS and glucose uptake bioassays. FJ as well as all its fractions were able to significantly decrease G6Pase activity (decrease from 20% to 61%) and increase the activity of GS (increase from 1.9- to 2.7- fold). In contrast, control juice (CJ) was without any effect, consistent with our previous observations (Vuong, Martineau et al. 2007). These results thus demonstrate that fermentation of blueberry juice also confers it the potential to control hepatic glucose output by reducing glucose production and increasing glucose storage. This effect was found to be associated to varying degrees with all 7 fractions that we tested.

In terms of glucose uptake in muscle cells, FJ was able to enhance glucose transport into C2C12 cells whereas CJ did not have any effect, as previously observed (Vuong, Martineau et al. 2007). This time, however, significant glucose transport activity was associated only with the three phenolic fractions (Phe, Early #1 and Early #2) of FJ. Our previous findings showed that the enhancement of glucose uptake by FJ involved the phosphorylation of AMPK (Vuong,

Martineau et al. 2007), a key regulator of energy balance implicated in the glucose homeostasis (Towler and Hardie 2007; He, Sabet et al. 2009). Additional studies will be required to determine if the three active fractions exert their action by the same mechanism as that of FJ.

Since all fractions were active in both G6Pase and GS assays but only the three phenolic fractions (Phe, Early #1 and Early #2) showed a significant effect on glucose uptake, we examined in details the constituents of these fractions. According to the HPLC analysis, we found that phenolic fractions contain mainly four compounds, namely *chlorogenic acid* (CA), *gallic acid* (GA), *protocatechuic acid* (PA) and *catechol* (Cat). These compounds are known for their antioxidant activity. Many studies showed some beneficial effects of CA, GA and PA. Indeed, CA has demonstrated anti-inflammatory, anti-diabetic, neuro-protective and cardio-protective properties (Shen, Qi et al. 2012; Cheng, Pogrebnyak et al. 2014; Hwang, Kim et al. 2014; Li, Shen et al. 2014). GA exerts anti-diabetic activities (Kade, Ogunbolude et al. 2013), improves hyperglycaemia and glucose tolerance (Bak, Kim et al. 2013), while offering protection against diabetes complications, notably through cardio-protective properties (Ramkumar, Vijayakumar et al. 2013; Umadevi, Gopi et al. 2013). On the other hand, PA possesses anti-inflammatory (Wei, Chu et al. 2013; Del Corno, Varano et al. 2014) and anti-apoptotic properties (Deng, Lee et al. 2014). It also improves angiogenesis (Kang, Zhu et al. 2013) and protects against hepatotoxicity (Liu, Wang et al. 2002). In contrast and to our knowledge, no recent studies have addressed effects of catechol on glucose metabolism. Thus, our study is the first to reveal the effect of these phenolic compounds on hepatic glucose homeostasis and glucose transport in muscle.



The four compounds were able to increase GS activity at similar levels comparatively to the FJ and the active fractions. GA and Cat showed stronger effect than the two others on the reduction of G6Pase activity. This effect was close to the FJ and the active fractions. In terms of glucose transport, GA and CA had similar effect whereas Cat had the most pronounced activity. Interestingly, Cat stands out in this study as having the best activity profile in almost all three bioassays, being as powerful and sometimes stronger than FJ and its phenolic active fractions themselves.

Altogether, the results of this study confirmed that fermentation of blueberry juice confers it anti-diabetic potential in muscle cells through the enhancement of glucose uptake, as shown in a previous study (Vuong, Martineau et al. 2007). Using a bioassay-guided fractionation approach, we now demonstrate that this activity resides principally in phenolic fractions and can be attributed, at least in part to CA, GA, PA and Cat.

In addition, our studies bring forth a novel mechanism of action for FJ that involves the regulation of key enzymes implicated in gluconeogenesis and glycogen synthesis in liver cells. Thereby, this confers additional anti-diabetic properties to FJ though its potential to reduce hepatic glucose production, a key component involved in systemic hyperglycemia.

Unlike muscle glucose uptake, bioassay-guided fractionation showed that all fractions of FJ could significantly reduce G6Pase and increase GS, albeit to varying degrees. Because of results on muscle glucose uptake (and technical challenges, notably with the heteropolymer fraction), we chose to concentrate our phytochemical characterization on the three phenolic fractions. Future studies will need to further examine effects of flavonoids, anthocyanins, heteropolymers and proanthocyanins present in FJ.

Nevertheless, analysis of the four major components of phenolic fractions of FJ confirmed that CA, GA, PA and Cat were also able, in varying degrees, to decrease G6Pase activity and to increase the activation of GS in cultured hepatocytes. This is congruent with studies showing anti-diabetic properties for CA and GA, whereas it adds potential beneficial actions for PA. However, of all pure compounds in our study, Cat stood out as the most promising constituent, showing activity similar to or higher than the parent FJ, as well as the insulin control, in all three bioassays. Our study thus provides important insights into novel potential anti-diabetic molecules. Further work is needed to elucidate in details the effect of these compounds on main signaling pathways implicated in hepatic glucose output and muscle glucose uptake. Nonetheless, the identified compounds can already help standardize FJ since they represent quality control tools to ensure the efficacy of FJ preparations.

## **5- Acknowledgments**

This study was funded by Agriculture and AgriFood Canada through its “Developing Innovative Agrifood Products” (DIAP) program. The project was carried out in collaboration with BioAtlantech and Vaccinium Technologies, Moncton, New-Brunswick, Canada; special thanks are expressed to John Argall and Denise Philpott. We also wish to thank Dr John Thor Arnason of the University of Ottawa for valuable discussions and advice.

## 6- Tables and Figures

Table 1: Concentration of samples used in G6Pase, GS and glucose uptake assays in H4IIE, HepG2 and C2C12 cells.

<b><u>Sample</u></b>	<b><u>H4IIE</u></b>	<b><u>HepG2</u></b>	<b><u>C2C12</u></b>
<b>Control Juice (CJ)</b>	5 µg/mL	5 µg/mL	12.5 µg/mL
<b>Fermented Juice (FJ)</b>	5 µg/mL	5 µg/mL	12.5 µg/mL
<b>Phe fraction</b>	5 µg/mL	5 µg/mL	12.5 µg/mL
<b>Early #1 fraction</b>	5 µg/mL	5 µg/mL	12.5 µg/mL
<b>Early #2 fraction</b>	5 µg/mL	5 µg/mL	12.5 µg/mL
<b>Flv fraction</b>	5 µg/mL	5 µg/mL	12.5 µg/mL
<b>Antho fraction</b>	5 µg/mL	5 µg/mL	12.5 µg/mL
<b>Hetero fraction</b>	5 µg/mL	5 µg/mL	12.5 µg/mL
<b>PAC fraction</b>	5 µg/mL	5 µg/mL	12.5 µg/mL
<b><i>Chlorogenic acid (CA)</i></b>	70.5 µM	70.5µM	70.5µM
<b><i>Gallic acid (GA)</i></b>	147 µM	147 µM	147 µM
<b><i>Protocatechuic acid (PA)</i></b>	162.2 µM	162.2 µM	162.2 µM
<b><i>Catechol (Cat)</i></b>	45.5 µM	45.5 µM	45.5 µM

Figure 1: Effect of FJ and its seven fractions on G6Pase (A) and GS (B) activity.

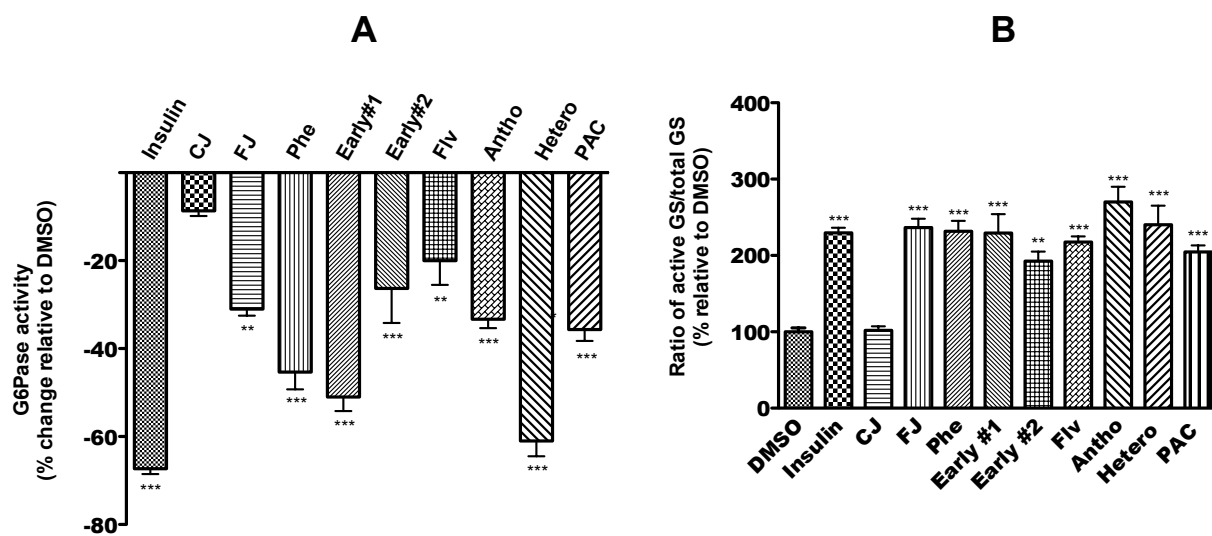


Figure 2: Effect of FJ and its seven fractions on  $^3\text{H}$ -deoxyglucose uptake.

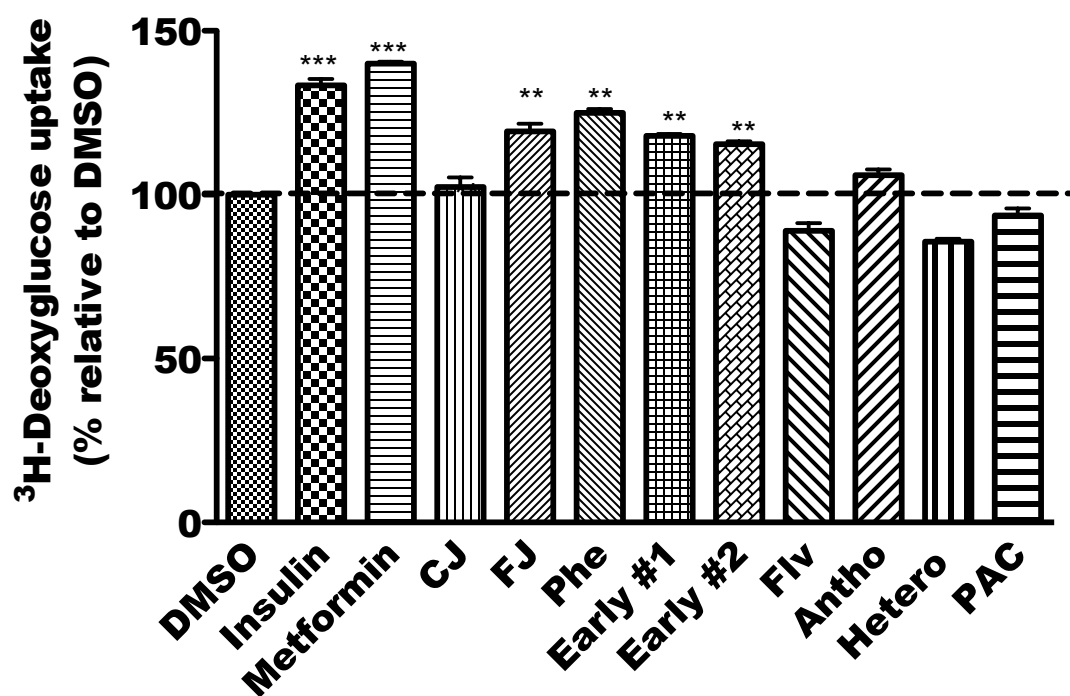


Figure 3: Effect of CA, GA, PA and Cat isolated from the active fractions of FJ on the activity of G6Pase (A) and GS (B).

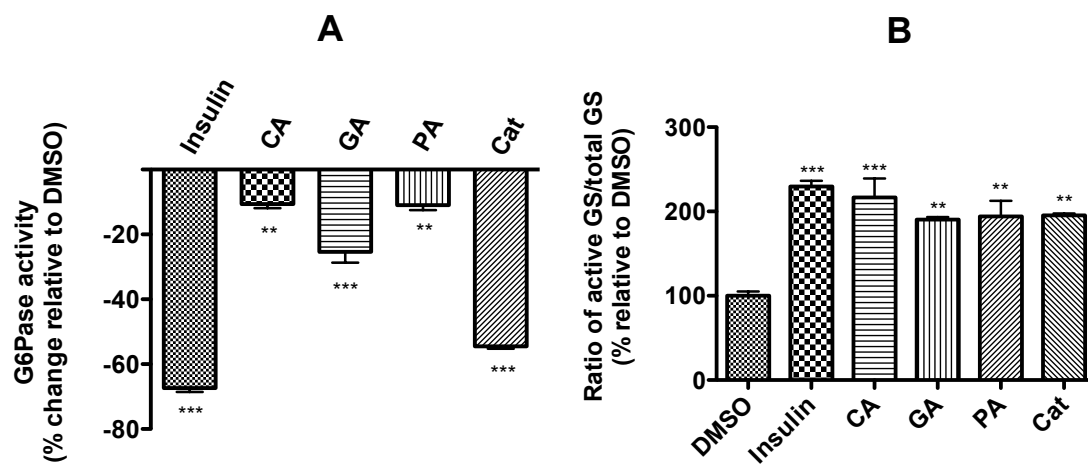
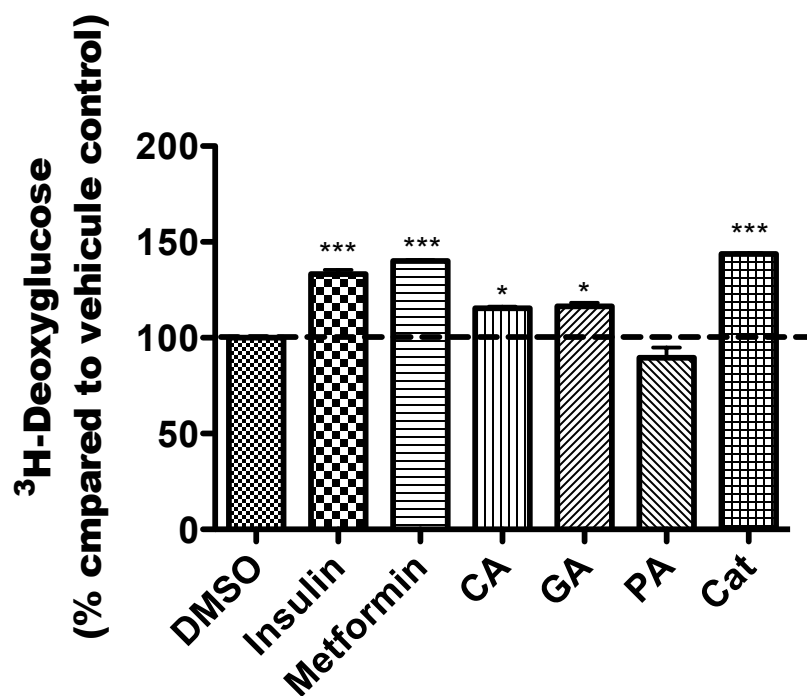


Figure 4: Effect of CA, GA, PA and Cat isolated from the active fractions of FJ on  $^3\text{H}$ -deoxyglucose uptake.



## 7- Table and Figure legends

Table 1: Concentration of samples used in G6Pase, GS and glucose uptake assays in H4IIE, HepG2 and C2C12 cells.

Figure 1: Effect of FJ and its seven fractions on G6Pase (A) and GS (B) activity.

Results shown represent the change in G6Pase (A) and GS (B) activity observed after overnight treatment of H4IIE and HepG2 cells with optimal non-toxic concentration of control (CJ) and fermented (FJ) blueberry juice (both at 5µg/mL) and the seven fractions yielded from FJ (at 5µg/mL). Results are expressed relative to DMSO (0.1%) vehicle control (A: 0% inhibition; B: 100 % activity). Insulin (100nM) was used as a positive control. \*\*:  $p < 0.01$  and \*\*\* :  $p < 0.001$  significantly different from DMSO (n=3 in triplicates).

Figure 2: Effect of FJ and its seven fractions on  $^3\text{H}$ -deoxyglucose uptake.

Results shown represent  $^3\text{H}$ -deoxyglucose uptake by C2C12 cells after overnight treatment with optimal non-toxic concentration of (CJ) and fermented (FJ) blueberry juice (both at 12.5µg/mL) and the seven fractions yielded from FJ (at 12.5µg/mL). Results are expressed as percentage relative to DMSO (0.1%) vehicle control. Insulin (100nM) and Metformin (400µM) were used as positive controls. \*\*:  $p < 0.01$  and \*\*\* :  $p < 0.001$  significantly different from DMSO (n=3 in triplicates).

Figure 3: Effect of CA, GA, PA and Cat isolated from the active fractions of FJ on the activity of G6Pase (A) and GS (B).

Results shown represent the change in G6Pase (A) and GS (B) activity observed after overnight treatment of H4IIE and HepG2 cells with CA (70.5µM), GA (147µM), PA (162.2µM) and Cat (45.5µM). Results are expressed relative to DMSO (0.1%) vehicle control (A: 0% inhibition; B: 100 % activity). Insulin (100nM) was used as a positive control. \*\*:  $p < 0.01$  and \*\*\* :  $p < 0.001$  significantly different from DMSO (n=3 in triplicates).

Figure 4: Effect of CA, GA, PA and Cat isolated from the active fractions of FJ on  $^3\text{H}$ -deoxyglucose uptake.



Results shown represent  $^3\text{H}$ -deoxyglucose uptake by C2C12 cells after overnight treatment with CA (70.5 $\mu\text{M}$ ), GA (147 $\mu\text{M}$ ), PA (162.2 $\mu\text{M}$ ) and Cat (45.5 $\mu\text{M}$ ). Results are expressed as percentage relative to DMSO (0.1%) vehicle control. Insulin (100nM) and Metformin (400 $\mu\text{M}$ ) were used as positive controls. \*:  $p < 0.05$  and \*\*\* :  $p < 0.001$  significantly different from DMSO (n=3 in triplicates).

## 8- References

1. IDF, *IDF Diabetes Atlas sixth edition*, T.N. Leonor Guariguata, Jessica Beagley, Ute Linnenkamp, Olivier Jacqmain, Editor 2013.
2. Weyer, C., et al., *A high fasting plasma insulin concentration predicts type 2 diabetes independent of insulin resistance: evidence for a pathogenic role of relative hyperinsulinemia*. Diabetes, 2000. **49**(12): p. 2094-101.
3. McFarland, B., et al., *Complementary and alternative medicine use in Canada and the United States*. Am J Public Health, 2002. **92**(10): p. 1616-8.
4. Nahas, R. and M. Moher, *Complementary and alternative medicine for the treatment of type 2 diabetes*. Can Fam Physician, 2009. **55**(6): p. 591-6.
5. Haddad, P.S., et al., *Use of antidiabetic plants in Morocco and Quebec*. Diabetes Care, 2001. **24**(3): p. 608-9.
6. Chambers, B.K. and M.E. Camire, *Can cranberry supplementation benefit adults with type 2 diabetes?* Diabetes Care, 2003. **26**(9): p. 2695-6.
7. Martineau, L.C., et al., *Anti-diabetic properties of the Canadian lowbush blueberry *Vaccinium angustifolium* Ait.* Phytomedicine, 2006. **13**(9-10): p. 612-23.
8. Harris, C.S., et al., *A single HPLC-PAD-APCI/MS method for the quantitative comparison of phenolic compounds found in leaf, stem, root and fruit extracts of *Vaccinium angustifolium**. Phytochem Anal, 2007. **18**(2): p. 161-9.
9. Manach, C., et al., *Polyphenols: food sources and bioavailability*. Am J Clin Nutr, 2004. **79**(5): p. 727-47.
10. Martin, L.J., Matar.C, *Increase of antioxidant capacity of the lowbush blueberry (*Vaccinium angustifolium*) during fermentation by a novel bacterium from the fruit microflora*. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2005. **85**.
11. Vuong, T., et al., *Fermented Canadian lowbush blueberry juice stimulates glucose uptake and AMP-activated protein kinase in insulin-sensitive cultured muscle cells and adipocytes*. Can J Physiol Pharmacol, 2007. **85**(9): p. 956-65.
12. Vuong, T., et al., *Antiobesity and antidiabetic effects of biotransformed blueberry juice in KKA(y) mice*. Int J Obes (Lond), 2009. **33**(10): p. 1166-73.

13. Beardsall, K., B.M. Diderholm, and D.B. Dunger, *Insulin and carbohydrate metabolism*. Best Pract Res Clin Endocrinol Metab, 2008. **22**(1): p. 41-55.
14. Puigserver, P., et al., *Insulin-regulated hepatic gluconeogenesis through FOXO1-PGC-1alpha interaction*. Nature, 2003. **423**(6939): p. 550-5.
15. Schmoll, D., et al., *Regulation of glucose-6-phosphatase gene expression by protein kinase Balpha and the forkhead transcription factor FKHR. Evidence for insulin response unit-dependent and -independent effects of insulin on promoter activity*. J Biol Chem, 2000. **275**(46): p. 36324-33.
16. Wang, Y. and P.J. Roach, *Inactivation of rabbit muscle glycogen synthase by glycogen synthase kinase-3. Dominant role of the phosphorylation of Ser-640 (site-3a)*. J Biol Chem, 1993. **268**(32): p. 23876-80.
17. Pessin, J.E., et al., *Molecular basis of insulin-stimulated GLUT4 vesicle trafficking. Location! Location! Location!* J Biol Chem, 1999. **274**(5): p. 2593-6.
18. Matchett, M.D., et al., *Inhibition of matrix metalloproteinase activity in DU145 human prostate cancer cells by flavonoids from lowbush blueberry (Vaccinium angustifolium): possible roles for protein kinase C and mitogen-activated protein-kinase-mediated events*. J Nutr Biochem, 2006. **17**(2): p. 117-25.
19. Vuong, T., et al., *Biotransformed blueberry juice protects neurons from hydrogen peroxide-induced oxidative stress and mitogen-activated protein kinase pathway alterations*. Br J Nutr, 2010. **104**(5): p. 656-63.
20. Nachar, A., et al., *The action of antidiabetic plants of the canadian james bay cree traditional pharmacopeia on key enzymes of hepatic glucose homeostasis*. Evid Based Complement Alternat Med, 2013. **2013**: p. 189819.
21. Thomas, J.A., K.K. Schlender, and J. Larner, *A rapid filter paper assay for UDPglucose-glycogen glucosyltransferase, including an improved biosynthesis of UDP-14C-glucose*. Anal Biochem, 1968. **25**(1): p. 486-99.
22. Silfen, M.E., et al., *Comparison of simple measures of insulin sensitivity in young girls with premature adrenarche: the fasting glucose to insulin ratio may be a simple and useful measure*. J Clin Endocrinol Metab, 2001. **86**(6): p. 2863-8.
23. Pessin, J.E. and A.R. Saltiel, *Signaling pathways in insulin action: molecular targets of insulin resistance*. J Clin Invest, 2000. **106**(2): p. 165-9.

24. Cross, D.A., et al., *Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by insulin mediated by protein kinase B*. Nature, 1995. **378**(6559): p. 785-9.
25. Mues, C., et al., *Regulation of glucose-6-phosphatase gene expression by insulin and metformin*. Horm Metab Res, 2009. **41**(10): p. 730-5.
26. Roach, P.J., *Glycogen and its metabolism*. Curr Mol Med, 2002. **2**(2): p. 101-20.
27. Towler, M.C. and D.G. Hardie, *AMP-activated protein kinase in metabolic control and insulin signaling*. Circ Res, 2007. **100**(3): p. 328-41.
28. He, L., et al., *Metformin and insulin suppress hepatic gluconeogenesis through phosphorylation of CREB binding protein*. Cell, 2009. **137**(4): p. 635-46.
29. Cheng, D.M., et al., *Development and phytochemical characterization of high polyphenol red lettuce with anti-diabetic properties*. PLoS One, 2014. **9**(3): p. e91571.
30. Shen, W., et al., *Chlorogenic acid inhibits LPS-induced microglial activation and improves survival of dopaminergic neurons*. Brain Res Bull, 2012. **88**(5): p. 487-94.
31. Hwang, S.J., et al., *Anti-inflammatory effects of chlorogenic acid in lipopolysaccharide-stimulated RAW 264.7 cells*. Inflamm Res, 2014. **63**(1): p. 81-90.
32. Li, Y., et al., *Chlorogenic acid prevents isoproterenol-induced hypertrophy in neonatal rat myocytes*. Toxicol Lett, 2014. **226**(3): p. 257-63.
33. Kade, I.J., et al., *Influence of gallic acid on oxidative stress-linked streptozotocin-induced pancreatic dysfunction in diabetic rats*. J Basic Clin Physiol Pharmacol, 2013: p. 1-11.
34. Bak, E.J., et al., *Gallic acid improves glucose tolerance and triglyceride concentration in diet-induced obesity mice*. Scand J Clin Lab Invest, 2013. **73**(8): p. 607-14.
35. Umadevi, S., V. Gopi, and E. Vellaichamy, *Inhibitory effect of gallic acid on advanced glycation end products induced up-regulation of inflammatory cytokines and matrix proteins in H9C2 (2-1) cells*. Cardiovasc Toxicol, 2013. **13**(4): p. 396-405.
36. Ramkumar, K., et al., *Protective effect of gallic acid on alloxan-induced oxidative stress and osmotic fragility in rats*. Hum Exp Toxicol, 2013. **33**(6): p. 638-649.
37. Del Corno, M., et al., *Protocatechuic acid inhibits human dendritic cell functional activation: Role of PPARgamma up-modulation*. Immunobiology, 2014. **219**(6): p. 416-24.

38. Wei, M., et al., *Protocatechuic acid suppresses ovalbumin-induced airway inflammation in a mouse allergic asthma model*. Int Immunopharmacol, 2013. **15**(4): p. 780-8.
39. Deng, J.S., et al., *Anti-apoptotic and pro-survival effect of protocatechuic acid on hypertensive hearts*. Chem Biol Interact, 2014. **209**: p. 77-84.
40. Kang, Z., et al., *Protocatechuic acid induces angiogenesis through PI3K-Akt-eNOS-VEGF signalling pathway*. Basic Clin Pharmacol Toxicol, 2013. **113**(4): p. 221-7.
41. Liu, C.L., et al., *In vivo protective effect of protocatechuic acid on tert-butyl hydroperoxide-induced rat hepatotoxicity*. Food Chem Toxicol, 2002. **40**(5): p. 635-41.

## Chapitre 5. Discussion générale et perspectives

Le diabète de type 2 est une maladie chronique qui touche près de 382 millions de personnes dans le monde. À cause de ses complications micro et macrovasculaires importantes, cette maladie représente actuellement la septième cause de décès au niveau mondial (WHO 2011; IDF 2013).

La population autochtone canadienne présente un risque de développer le diabète de type 2 de 3 à 5 fois plus élevé que la population canadienne en général (Ekoe, Thouez et al. 1990). Les communautés autochtones comme plusieurs populations dans le monde ont recours à l'utilisation de leur médecine traditionnelle pour traiter le diabète et ses symptômes. Cette utilisation fait partie de leur culture héritée de leurs parents et grands-parents.

Dernièrement, la recherche s'est bien penchée vers la médecine alternative et ses produits pour trouver de nouvelles molécules efficaces pour le traitement de plusieurs maladies et cela dans le contexte de l'amélioration de la qualité de vie des patients. L'exemple le plus courant est la metformine, l'hypoglycémiant oral le plus utilisé au monde. La metformine est un dérivé de la guanidine, composé naturel qui a été isolé à partir de *Galega officinalis* (Yeh, Eisenberg et al. 2003).

Notre équipe de recherche s'est intéressée à évaluer les propriétés antidiabétiques de certaines plantes utilisées dans la médecine traditionnelle des Cris de la région de la Baie James du Nord de Québec. Suite à une enquête ethnobotanique détaillée, 17 plantes ont été identifiées et sélectionnées, et ont été le sujet de plusieurs études consécutives afin d'élucider leur effet antidiabétique et leurs mécanismes d'action (Leduc, Coonishish et al. 2006; Spoor, Martineau et al. 2006; Fraser, Cuerrier et al. 2007). Deux études effectuées sur les 17 plantes dans deux lignées cellulaires différentes, adipocytes 3T3-L1 et cellules musculaires C2C12, ont montré que certaines plantes parmi celles testées sont capables d'augmenter l'adipogenèse et de stimuler le transport de glucose de manière respective (Spoor, Martineau et al. 2006; Harbilas, Martineau et al. 2009). Une étude réalisée au niveau des cellules intestinales Caco-2 a montré que 13 parmi les 17 plantes testées sont capables de diminuer l'absorption de glucose par les cellules intestinales (Nistor Baldea, Martineau et al. 2010). D'autres études effectuées par la suite ont aidé à comprendre par quels mécanismes d'action certaines plantes prometteuses

exercent leur effet anti-diabétique et à isoler certains composants actifs à partir des extraits bruts (Eid, Martineau et al. 2010; Martineau, Adeyiwola-Spoor et al. 2010; Martineau, Herve et al. 2010; Martineau, Muhammad et al. 2010). Une validation de cet effet anti-diabétique ou anti-obésité de certaines plantes et leurs composants actifs a été effectuée dans des modèles d'animaux obèses et insulino-résistants (Harbilas, Brault et al. 2012; Harbilas, Vallerand et al. 2012; Harbilas, Vallerand et al. 2013).

L'homéostasie du glucose résulte d'un équilibre entre l'absorption de glucose par les cellules intestinales, sa production par le foie et son utilisation par les tissus périphériques comme le muscle et le tissu adipeux (Beardsall, Diderholm et al. 2008).

Le foie représente l'organe essentiel de production de glucose et de son stockage sous forme de glycogène. Ces deux processus sont réalisés séparément par l'action de plusieurs enzymes; les plus importantes sont la G6Pase impliquées dans la voie de production de glucose (néoglucogénèse) (Schmoll, Walker et al. 2000) et la GS impliquée dans la voie de stockage de glucose sous forme de glycogène (glycogénogénèse) (Martinez, Castro et al. 2002). Ainsi une diminution de l'activité de la G6Pase et une augmentation de celle de la GS aboutit à une diminution de production hépatique de glucose et par ricochet, de la glycémie. Un tel mécanisme est observé pour la metformine suite à l'activation de l'AMPK (Winder and Hardie 1999; Ducobu 2003).

Tel que mentionné, les études de criblage de l'effet anti-diabétique des plantes effectuées précédemment concernaient principalement les cellules intestinales, musculaires et les adipocytes. Aucune étude n'a été faite chez des cellules hépatiques, d'où la réalisation de notre projet. Cette thèse comporte en grande partie une étude de criblage réalisée avec les 17 plantes chez des cellules hépatiques afin d'évaluer leur effet anti-diabétique sur le foie et d'élucider leurs mécanismes d'action.

Les résultats de cette thèse ont montré qu'une partie du potentiel thérapeutique de certaines plantes utilisées dans la médecine traditionnelle Crie implique le contrôle de l'homéostasie hépatique de glucose. En effet, parmi les 17 plantes sélectionnées 7 étaient capables de diminuer l'activité de la G6Pase et donc la production de glucose dans les cellules hépatiques H4IIE. Les plantes les plus prometteuses exercent leur effet en partie à travers la phosphorylation de l'Akt et/ou de l'AMPK; deux kinases importantes impliquées dans le contrôle du métabolisme hépatique (Herzig, Long et al. 2001; Viollet, Mounier et al. 2007).

D'autre part, plusieurs plantes étaient capables d'augmenter l'activité de la GS et cela suite à la phosphorylation de la GSK-3, la kinase impliquée dans la voie de glycogénogenèse. La phosphorylation de cette dernière par l'insuline aboutit à son inactivation et relève ainsi l'effet inhibant qu'elle possède envers l'activité de la GS (Wang and Roach 1993; Cross, Alessi et al. 1994); amenant donc une activation de la GS. Trois extraits de plante se sont démarqués dans notre étude par leur effet anti-diabétique observé sur les cellules hépatiques, *Picea glauca*, *Larix laricina* et *Abies balsamea*. Il a été démontré précédemment que *P. glauca* possède des effets de neuroprotection (Harbilas, Martineau et al. 2009), mais ne possède aucun effet sur le transport de glucose ou l'adipogenèse. Cette thèse a montré que *P. glauca* possède un potentiel dans le contrôle de l'homéostasie hépatique de glucose et cela en diminuant la production de glucose par un mécanisme impliquant les 2 voies de signalisation insulino –dépendante et indépendante (phosphorylation de l'Akt et de l'AMPK respectivement). Pour sa part, *L. laricina* a démontré un effet significatif sur l'augmentation de l'activité de la GS suite à la phosphorylation de la GSK-3. Cet effet anti-diabétique important dans les cellules hépatiques s'ajoute à d'autres effets démontrés *in vitro* dans d'autres lignées cellulaires et *in vivo* pour le même extrait de plante. Il a été démontré que *L. laricina* est capable d'augmenter le transport de glucose (Spor, Martineau et al. 2006) et la phosphorylation de l'AMPK (Martineau, Adeyiwola-Spor et al. 2010) dans les cellules musculaires C2C12 ainsi que l'adipogenèse dans les adipocytes 3T3-L1 (Spor, Martineau et al. 2006). Par la suite, une étude *in vivo* avait démontré l'effet de *L. laricina* sur la diminution de la glycémie et l'amélioration de la résistance à l'insuline dans un modèle animal de souris obèses et insulino-résistantes (Harbilas, Vallerand et al. 2012).

Par ailleurs, les résultats de cette étude ont mis en évidence l'effet important de l'extrait d'*A. balsamea* sur certaines enzymes clefs et kinases impliquées dans la modulation de la production hépatique de glucose. En effet, *A. balsamea* a diminué l'activité de la G6Pase par un mécanisme impliquant la phosphorylation de l'Akt et de l'AMPK en même temps. L'activation de la voie insulino-indépendante (AMPK) montre un effet de la plante semblable à celui de la metformine sur la production de glucose dans le foie. D'autre part, *A. balsamea* était l'extrait le plus puissant sur l'activation de la GS. Cette action a été également associée à une phosphorylation de la GSK-3. Ainsi, *A. balsamea* était la seule plante Crie capable d'affecter simultanément et puissamment les deux voies principales impliquées dans



l'homéostasie hépatique de glucose. De même, des études précédentes effectuées dans notre laboratoire avaient montré qu'*A.balsamea* est capable de stimuler le transport de glucose dans les cellules musculaires et les adipocytes (Spoor, Martineau et al. 2006).

En se basant sur ces résultats et ceux d'autres études précédentes réalisées sur une ou plusieurs plantes médicinales Cries, un profil pourra être attribué à chaque extrait de plante possédant un potentiel anti-diabétique ou anti-obésité. Ce profil pourra aider dans la compréhension du mécanisme d'action des extraits de plante et aidera les praticiens dans le choix d'une ou d'un mélange de plantes pour être utilisé dans le contexte du traitement ou de la prévention du diabète et de l'obésité. Ainsi, des plantes ayant des cibles différentes pourront être données ensemble afin d'avoir des activités complémentaires dans le but diminuer la glycémie. Un bon exemple sera une combinaison de *Populus balsamifera* avec *A.balsamea*. Selon nos résultats, *P.balsamifera* avait seulement montré un effet au niveau de la diminution de la production de glucose par les cellules hépatiques. Mais les études effectuées précédemment révèlent la capacité de cet extrait à diminuer l'adipogenèse au niveau des adipocytes ce qui lui confère un effet anti-obésité (Harbilas, Martineau et al. 2009) qui a été par la suite validé dans un modèle de souris obèses et insulino-résistantes (Harbilas, Vallerand et al. 2013). Ainsi une combinaison de l'extrait de *P.balsamifera* avec celui d'*A.balsamea* pourra présenter une bonne approche thérapeutique alternative afin de traiter le diabète et l'obésité.

Les résultats de cette thèse nous ont montré que l'extrait d'*A.balsamea* possède le profil le plus prometteur dans le contrôle de l'homéostasie hépatique de glucose. Ce qui nous a conduit à explorer plus en détail les constituants de cet extrait dans le but de trouver des principes actifs responsables de son activité et de tester leur effet sur les enzymes et les kinases impliquées dans la néoglucogenèse et la glycogénogenèse. Ainsi, un fractionnement guidé par les bioessais de la G6Pase et la GS a été réalisé en utilisant 4 solvants de degrés de polarité différents (hexane, EtOAc, MeOH et H<sub>2</sub>O). Les résultats des bioessais effectués sur les 4 fractions résultantes ont montré que l'activité d'*A.balsamea* est surtout reliée à sa fraction hexane. Des études phytochimiques plus détaillées de cette fraction ont permis d'isoler 3 composés actifs majeurs, l'acide abiétique (*abietic acid* : AA), l'acide déhydroabiétique (*dehydroabietic acid* : DAA) et le squalène (*squalene* : SQ), qui appartiennent à la famille des terpènes. Ces 3 composés ont montré un effet important sur la diminution de l'activité de la G6Pase. Une forte corrélation linéaire a montré que la phosphorylation de l'Akt et de l'AMPK

séparément pourrait expliquer l'effet des composés sur la réduction de l'activité de l'enzyme. En plus les 3 composés étaient capables d'augmenter l'activité de la GS avec une forte corrélation observée entre l'effet des composés sur la phosphorylation de la GSK-3 et l'activation de la GS. Dans tous les cas, les constituants actifs d'*A.balsamea* ont montré un mécanisme d'action similaire à l'extrait brut et qui est à la base de leur effet antidiabétique.

Malgré les données présentes dans la littérature à propos des études réalisées sur nos 3 composés actifs, les résultats de notre thèse amènent un nouveau concept dans l'étude de leurs effets bénéfiques. Les résultats de notre thèse ont révélé un mode d'action intéressant des composés actifs isolés à partir de l'extrait brut d'*A.balsamea* au niveau du foie. Ils ont été capables d'activer la voie de l'insuline et en même temps la voie de l'AMPK. De même nous avons pu démontrer qu'ils sont capables de stimuler l'activité de la GS pour augmenter le stockage de glucose sous forme de glycogène et cela suite à l'inactivation de la GSK-3. Ainsi ces 3 composés peuvent être considérés comme des molécules insulino-sensibilisatrices et possèdent un mode d'action semblable à la metformine en plus de leur capacité de stimuler la voie de l'insuline. Nos résultats ont révélé aussi que le DAA s'est démarqué avec ses effets toujours supérieurs aux 2 autres composés dans toutes les expériences et presque similaires à ceux de l'extrait brut d'*A.balsamea*.

Aucune étude de toxicité ou de non-sureté n'a été reportée auprès de l'utilisation de ces composés chez les animaux ou les êtres humains. De notre part, nous avons pu démontrer que les composés actifs sont sans effet toxique à la concentration introduite aux cellules hépatiques mais la prochaine étape sera de les introduire à des animaux pour tester leur innocuité et la possibilité d'avoir des effets secondaires.

L'interprétation des résultats de l'étude des 17 plantes Cries suivi du fractionnement d'*A. balsamea* permet de considérer cet extrait comme une bonne approche thérapeutique complémentaire pour les patients autochtones diabétiques qui désirent avoir accès à leur médecine traditionnelle tout en étant suivis par les professionnels de la santé des communautés. Cette thèse a ajouté une bonne compréhension du mécanisme d'action probable de certaines plantes connus pour leur effet anti-diabétique et surtout pour l'extrait d'*A. balsamea*. En plus, nous avons pu isoler et identifier 3 constituants actifs qui ont montré un mécanisme d'action très similaire à l'extrait brut au niveau de l'homéostasie hépatique de glucose. Étant donné que l'utilisation du glucose au niveau des tissus périphériques joue un

rôle majeur dans la diminution de la glycémie, il faut évaluer l'effet des composés sur le transport de glucose dans les cellules musculaires et les adipocytes pour le comparer avec celui d'*A.balsamea*. Une étude *in vivo* ultérieure sera intéressante aussi pour tester les constituants actifs dans un modèle animal de souris obèses et insulino-résistantes. Les données de cette thèse constitueront une bonne base pour ces études dans le futur.

En partant du même concept de recherche de produits de santé naturels actifs et puissants au niveau de l'amélioration de l'hyperglycémie et de la sensibilité à l'insuline, on s'est penché dans notre thèse vers un autre produit de la forêt boréale, le bleuet nain du genre *Vaccinium angustifolium*. Plus particulièrement le jus de bleuet et le jus de bleuet biotransformé. Le bleuet sauvage canadien est connu par son activité anti-diabétique et a été utilisé depuis plusieurs années dans la médecine traditionnelle de plusieurs populations (Haddad, Depot et al. 2001; Chambers and Camire 2003). Des études effectuées dans notre laboratoire ont montré que le bleuet possède des effets semblables à l'insuline (insulin-like), aux glitazones (glitazone-like) ainsi que des effets de cytoprotection (Martineau, Couture et al. 2006) et contient plusieurs composés phénoliques (Manach, Scalbert et al. 2004; Harris, Burt et al. 2007). En se basant sur les résultats d'une étude qui ont montré que la biotransformation du jus de bleuet est capable de changer la composition du jus en augmentant sa teneur en composés phénoliques et son activité antioxydante (Martin 2005), notre laboratoire a effectué plusieurs études sur le jus de bleuet biotransformé (BJ). Les résultats ont montré que le BJ est capable de stimuler le transport de glucose dans les cellules musculaires C2C12 et les adipocytes 3T3-L1 par un mécanisme impliquant la phosphorylation de l'AMPK (Vuong, Martineau et al. 2007). Une étude *in vivo* a par la suite confirmé l'activité anti-diabétique et anti-obésité du BJ dans un modèle de souris KKA(y). Un effet très remarquable a été observé au niveau de l'augmentation du taux d'adiponectine par le BJ ce qui lui confère un effet semblable aux TZDs au niveau de l'amélioration de la sensibilité à l'insuline sans avoir des effets secondaires sur la prise de poids et cela grâce à sa capacité d'inhiber l'adipogenèse (Vuong, Benhaddou-Andaloussi et al. 2009).

Les résultats de cette thèse viennent appuyer les conclusions des études précédentes et ont permis d'identifier les principes actifs qui sont à la base de l'activité du BJ dans le muscle et le

foie. Les résultats au niveau des cellules hépatiques ont montré pour la première fois que le BJ est capable de diminuer l'activité de la G6Pase et d'augmenter celle de la GS. Ces résultats ont ajouté un nouveau mécanisme d'action pour le BJ en ce qui concerne son effet anti-diabétique et dont la cible est la diminution de la production hépatique de glucose. Les résultats du transport de glucose ont confirmé la capacité du BJ de stimuler le transport de glucose dans les cellules musculaires C2C12; ceci a bien été démontré précédemment (Vuong, Martineau et al. 2007). Tous ces résultats ensemble confèrent au BJ un mécanisme d'action très semblable à celui de la metformine au niveau du muscle et du foie en plus d'une capacité d'améliorer la sensibilité à l'insuline en augmentant le taux d'adiponectine. Ceci lui donne un avantage d'utilisation comme approche thérapeutique complémentaire mais évidemment après avoir subi les preuves d'innocuité et d'efficacité auprès des organismes concernés à la santé et la sécurité des patients.

Toujours dans le but de trouver les principes actifs contenus dans le BJ, un fractionnement guidé par les bioessais de la G6Pase, la GS et le transport de glucose a été effectué et sept fractions ont été obtenues à partir du BJ. Toutes les fractions ont diminué l'activité de la G6Pase et ont augmenté celle de la GS à des degrés différents. Les fractions riches en composés phénoliques (Phe, Early# 1 et Early# 2) étaient capables de stimuler le transport de glucose. La fraction Phe avait un effet un peu supérieur à celui du BJ lui même. Cela nous a conduit à étudier plus en détail ces fractions et à déterminer leurs constituants actifs. Nous avons pu isoler 4 composés majeurs, soit l'*acide chlorogénique* (*chlorogenic acid* : CA), l'*acide gallique* (*gallic acid* : GA), l'*acide protocatéchique* (*protocatechuic acid* : PA), et le *catéchol* (*catechol* Cat). Ces 4 molécules sont des composés phénoliques connus par leur effet antioxydant. Quelques études ont montré aussi que le CA et le GA possèdent des activités anti-diabétiques (Bak, Kim et al. 2013; Kade, Ogunbolude et al. 2013; Cheng, Pogrebnyak et al. 2014). Il n'y a pas beaucoup de données dans la littérature sur le rôle du *catéchol* sur le métabolisme. Notre étude a montré qu'ils sont sans effet toxique sur les cellules musculaires et les cellules hépatiques à des concentrations bien déterminées selon l'essai de cytotoxicité de la LDH.

Les résultats de cette thèse ont montré que les 4 composés avaient des effets similaires sur l'activation de la GS. Le GA et le *catéchol* étaient capables de diminuer l'activité de la G6Pase ainsi que de stimuler le transport de glucose. Leurs effets ressemblaient à ceux du BJ sauf que le *catéchol* s'est démarqué en ayant les effets les plus importants dans les 3 bioessais

et en dépassant même celui du BJ. Quelques expériences supplémentaires pourront nous montrer si un mélange de 2 composés ou plus, isolés à partir du BJ, aura un effet additif (synergie) sur le contrôle des activités enzymatiques ou le transport de glucose. Il manque aussi l'étude des voies de signalisation impliquées dans les processus de production de glucose et son transport dans le muscle afin de valider si les composés isolés ont le même mécanisme d'action que le BJ. Ceci va sûrement faire l'objet d'une étude ultérieure dans le laboratoire. Par la suite, une étude *in vivo* nous validera les résultats obtenus *in vitro* et cela en testant l'effet des constituants actifs isolés à partir du BJ sur la diminution de la glycémie et l'amélioration de la sensibilité à l'insuline chez des souris KKA(y). Une étude de toxicité servira aussi à déterminer la sécurité de ces composés sur le fonctionnement cellulaire et moléculaire chez ces animaux.

Malgré la nécessité d'expériences supplémentaires, les résultats de cette thèse ont aidé à mettre en relief l'effet anti-diabétique de deux produits de santé naturels, à identifier leurs mécanismes d'action probables ainsi qu'à isoler les constituants actifs responsables de leur effet.

*A.balsamea* peut être potentiellement considérée comme une bonne approche thérapeutique complémentaire pour les populations autochtones souffrant de diabète de type 2. L'isolation de ses constituants actifs permettra un meilleur contrôle de la qualité des préparations traditionnelles. Ces composés serviront peut-être aussi de modèles dans la recherche de nouvelles molécules anti-diabétiques.

Le BJ constitue une bonne source de composés phénoliques ayant plusieurs effets bénéfiques sur la santé. Cette thèse a montré que les constituants actifs du BJ ont un effet sur l'homéostasie de glucose et cela pourra constituer une base pour la normalisation du BJ. Des études *in vivo* de toxicité et de validation de l'effet des 4 composés isolés suivies d'études cliniques seront utiles pour déterminer l'innocuité et l'efficacité de ces molécules.

## Bibliographie

- Abel, E. D., K. M. O'Shea, et al. (2012). "Insulin resistance: metabolic mechanisms and consequences in the heart." *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **32**(9): 2068-2076.
- Ahima, R. S. and J. S. Flier (2000). "Leptin." *Annu Rev Physiol* **62**: 413-437.
- Alessi, D. R., S. R. James, et al. (1997). "Characterization of a 3-phosphoinositide-dependent protein kinase which phosphorylates and activates protein kinase B $\alpha$ ." *Curr Biol* **7**(4): 261-269.
- Ambavane, V., R. Patil, et al. (2002). "Repaglinide: a short acting insulin secretagogue for postprandial hyperglycaemia." *J Postgrad Med* **48**(3): 246-248.
- Anthonsen, M. W., L. Ronnstrand, et al. (1998). "Identification of novel phosphorylation sites in hormone-sensitive lipase that are phosphorylated in response to isoproterenol and govern activation properties in vitro." *J Biol Chem* **273**(1): 215-221.
- Araki, E. and T. Nishikawa (2010). "Oxidative stress: A cause and therapeutic target of diabetic complications." *J Diabetes Investig* **1**(3): 90-96.
- Augustin, R. (2010). "The protein family of glucose transport facilitators: It's not only about glucose after all." *IUBMB Life* **62**(5): 315-333.
- Bailey, C. J. and R. C. Turner (1996). "Metformin." *N Engl J Med* **334**(9): 574-579.
- Bak, E. J., J. Kim, et al. (2013). "Gallic acid improves glucose tolerance and triglyceride concentration in diet-induced obesity mice." *Scand J Clin Lab Invest* **73**(8): 607-614.
- Ballard, F. J., R. W. Hanson, et al. (1967). "Phosphoenolpyruvate carboxykinase and the synthesis of glyceride-glycerol from pyruvate in adipose tissue." *J Biol Chem* **242**(11): 2746-2750.
- Bastard, J. P., M. Maachi, et al. (2006). "Recent advances in the relationship between obesity, inflammation, and insulin resistance." *Eur Cytokine Netw* **17**(1): 4-12.
- Baumann, C. A., V. Ribon, et al. (2000). "CAP defines a second signalling pathway required for insulin-stimulated glucose transport." *Nature* **407**(6801): 202-207.
- Beardsall, K., B. M. Diderholm, et al. (2008). "Insulin and carbohydrate metabolism." *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* **22**(1): 41-55.
- Bergman, R. N. and M. Ader (2000). "Free fatty acids and pathogenesis of type 2 diabetes mellitus." *Trends Endocrinol Metab* **11**(9): 351-356.
- Boden, G. (2011). "Obesity, insulin resistance and free fatty acids." *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes* **18**(2): 139-143.
- Bonner-Weir, S. (2000). "Islet growth and development in the adult." *J Mol Endocrinol* **24**(3): 297-302.
- Boulton, T. G., S. H. Nye, et al. (1991). "ERKs: a family of protein-serine/threonine kinases that are activated and tyrosine phosphorylated in response to insulin and NGF." *Cell* **65**(4): 663-675.
- Brady, M. J., A. C. Nairn, et al. (1997). "The regulation of glycogen synthase by protein phosphatase 1 in 3T3-L1 adipocytes. Evidence for a potential role for DARPP-32 in insulin action." *J Biol Chem* **272**(47): 29698-29703.
- Breen, D. M., T. Sanli, et al. (2008). "Stimulation of muscle cell glucose uptake by resveratrol through sirtuins and AMPK." *Biochem Biophys Res Commun* **374**(1): 117-122.

- Cavaghan, M. K., D. A. Ehrmann, et al. (2000). "Interactions between insulin resistance and insulin secretion in the development of glucose intolerance." J Clin Invest **106**(3): 329-333.
- Chambers, B. K. and M. E. Camire (2003). "Can cranberry supplementation benefit adults with type 2 diabetes?" Diabetes Care **26**(9): 2695-2696.
- Cheng, D. M., N. Pogrebnyak, et al. (2014). "Development and phytochemical characterization of high polyphenol red lettuce with anti-diabetic properties." PLoS One **9**(3): e91571.
- Cheng, K. K., M. A. Iglesias, et al. (2009). "APPL1 potentiates insulin-mediated inhibition of hepatic glucose production and alleviates diabetes via Akt activation in mice." Cell Metab **9**(5): 417-427.
- Chi, T. C., W. P. Chen, et al. (2007). "Phosphatidylinositol-3-kinase is involved in the antihyperglycemic effect induced by resveratrol in streptozotocin-induced diabetic rats." Life Sci **80**(18): 1713-1720.
- Chiang, D. J., M. T. Pritchard, et al. (2011). "Obesity, diabetes mellitus, and liver fibrosis." Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol **300**(5): G697-702.
- Chiang, S. H., C. A. Baumann, et al. (2001). "Insulin-stimulated GLUT4 translocation requires the CAP-dependent activation of TC10." Nature **410**(6831): 944-948.
- Chung, K. T., T. Y. Wong, et al. (1998). "Tannins and human health: a review." Crit Rev Food Sci Nutr **38**(6): 421-464.
- Clement, K. and D. Langin (2007). "Regulation of inflammation-related genes in human adipose tissue." J Intern Med **262**(4): 422-430.
- Cohen, P. and M. Goedert (2004). "GSK3 inhibitors: development and therapeutic potential." Nat Rev Drug Discov **3**(6): 479-487.
- Cross, D. A., D. R. Alessi, et al. (1995). "Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by insulin mediated by protein kinase B." Nature **378**(6559): 785-789.
- Cross, D. A., D. R. Alessi, et al. (1994). "The inhibition of glycogen synthase kinase-3 by insulin or insulin-like growth factor 1 in the rat skeletal muscle cell line L6 is blocked by wortmannin, but not by rapamycin: evidence that wortmannin blocks activation of the mitogen-activated protein kinase pathway in L6 cells between Ras and Raf." Biochem J **303** ( Pt 1): 21-26.
- Das, D. K. and N. Maulik (2006). "Resveratrol in cardioprotection: a therapeutic promise of alternative medicine." Mol Interv **6**(1): 36-47.
- De Souza, L. R., A. L. Jenkins, et al. (2011). "Korean red ginseng (*Panax ginseng* C.A. Meyer) root fractions: differential effects on postprandial glycemia in healthy individuals." J Ethnopharmacol **137**(1): 245-250.
- Del Corno, M., B. Varano, et al. (2014). "Protocatechuic acid inhibits human dendritic cell functional activation: Role of PPARgamma up-modulation." Immunobiology.
- Deng, J. S., S. D. Lee, et al. (2014). "Anti-apoptotic and pro-survival effect of protocatechuic acid on hypertensive hearts." Chem Biol Interact **209**: 77-84.
- Dong, Y., L. Wang, et al. (2003). "Analysis of glucose and lactate in hippocampal dialysates of rats during the operant conditioned reflex using microdialysis." Neurochem Int **43**(1): 67-72.
- Ducobu, J. (2003). "[Oral antidiabetic drugs in 2003]." Rev Med Brux **24**(4): A361-368.

- Duenas, M., B. Sun, et al. (2003). "Proanthocyanidin composition in the seed coat of lentils (*Lens culinaris* L.)." *J Agric Food Chem* **51**(27): 7999-8004.
- Edelman, S. V., S. Garg, et al. (2007). "Is pramlintide a safe and effective adjunct therapy for patients with type 1 diabetes?" *Nat Clin Pract Endocrinol Metab* **3**(5): E1; discussion E2.
- Efrat, S. (2008). "Beta-cell replacement for insulin-dependent diabetes mellitus." *Adv Drug Deliv Rev* **60**(2): 114-123.
- Eid, H. M., L. C. Martineau, et al. (2010). "Stimulation of AMP-activated protein kinase and enhancement of basal glucose uptake in muscle cells by quercetin and quercetin glycosides, active principles of the antidiabetic medicinal plant *Vaccinium vitis-idaea*." *Mol Nutr Food Res* **54**(7): 991-1003.
- Ekoe, J. M., J. P. Thouez, et al. (1990). "Epidemiology of obesity in relationship to some chronic medical conditions among Inuit and Cree Indian populations in New Quebec, Canada." *Diabetes Res Clin Pract* **10 Suppl 1**: S17-27.
- Fain, J. N., A. K. Madan, et al. (2004). "Comparison of the release of adipokines by adipose tissue, adipose tissue matrix, and adipocytes from visceral and subcutaneous abdominal adipose tissues of obese humans." *Endocrinology* **145**(5): 2273-2282.
- Fernandez, M. A., M. P. Tornos, et al. (2001). "Anti-inflammatory activity of abietic acid, a diterpene isolated from *Pimenta racemosa* var. *grisea*." *J Pharm Pharmacol* **53**(6): 867-872.
- Fraser, M. H., A. Cuerrier, et al. (2007). "Medicinal plants of Cree communities (Quebec, Canada): antioxidant activity of plants used to treat type 2 diabetes symptoms." *Can J Physiol Pharmacol* **85**(11): 1200-1214.
- Gallagher, E. J., D. Leroith, et al. (2010). "Insulin resistance in obesity as the underlying cause for the metabolic syndrome." *Mt Sinai J Med* **77**(5): 511-523.
- Gao, C. L., D. Y. Zhao, et al. (2009). "Resistin induces rat insulinoma cell RINm5F apoptosis." *Mol Biol Rep* **36**(7): 1703-1708.
- Gao, J., C. Chang Chua, et al. (2007). "Resistin, an adipocytokine, offers protection against acute myocardial infarction." *J Mol Cell Cardiol* **43**(5): 601-609.
- Garriguet, D. (2008). "Obesity and the eating habits of the Aboriginal population." *Health Rep* **19**(1): 21-35.
- Giacco, F. and M. Brownlee (2010). "Oxidative stress and diabetic complications." *Circ Res* **107**(9): 1058-1070.
- Gonzalez, C., V. Beruto, et al. (2006). "Investigational treatments for Type 2 diabetes mellitus: exenatide and liraglutide." *Expert Opin Investig Drugs* **15**(8): 887-895.
- Gonzalez-Mujica, F., N. Motta, et al. (2005). "Inhibition of hepatic neoglucogenesis and glucose-6-phosphatase by quercetin 3-O-alpha(2"-galloyl)rhamnoside isolated from *Bauhinia megalandra* leaves." *Phytother Res* **19**(7): 624-627.
- Grace, M. H., D. M. Ribnicky, et al. (2009). "Hypoglycemic activity of a novel anthocyanin-rich formulation from lowbush blueberry, *Vaccinium angustifolium* Aiton." *Phytomedicine* **16**(5): 406-415.
- Grimes, C. A. and R. S. Jope (2001). "The multifaceted roles of glycogen synthase kinase 3beta in cellular signaling." *Prog Neurobiol* **65**(4): 391-426.
- Gu, L., M. Kelm, et al. (2002). "Fractionation of polymeric procyanidins from lowbush blueberry and quantification of procyanidins in selected foods with an optimized



- normal-phase HPLC-MS fluorescent detection method." J Agric Food Chem **50**(17): 4852-4860.
- Guerrero-Analco, J. A., L. Martineau, et al. (2010). "Bioassay-guided isolation of the antidiabetic principle from *Sorbus decora* (Rosaceae) used traditionally by the Eeyou Istchee Cree First Nations." J Nat Prod **73**(9): 1519-1523.
- Gupte, A. and S. Mora (2006). "Activation of the Cbl insulin signaling pathway in cardiac muscle; dysregulation in obesity and diabetes." Biochem Biophys Res Commun **342**(3): 751-757.
- Haddad, P. S., M. Depot, et al. (2001). "Use of antidiabetic plants in Morocco and Quebec." Diabetes Care **24**(3): 608-609.
- Haddad, P. S., L. Musallam, et al. (2012). "Comprehensive evidence-based assessment and prioritization of potential antidiabetic medicinal plants: a case study from canadian eastern james bay cree traditional medicine." Evid Based Complement Alternat Med **2012**: 893426.
- Hakkinen, S. H., S. O. Karenlampi, et al. (1999). "Content of the flavonols quercetin, myricetin, and kaempferol in 25 edible berries." J Agric Food Chem **47**(6): 2274-2279.
- Halimi, S. (2008). "DPP-4 inhibitors and GLP-1 analogues: for whom? Which place for incretins in the management of type 2 diabetic patients?" Diabetes Metab **34 Suppl 2**: S91-95.
- Hall, D. E., P. Zerbe, et al. (2013). "Evolution of conifer diterpene synthases: diterpene resin acid biosynthesis in lodgepole pine and jack pine involves monofunctional and bifunctional diterpene synthases." Plant Physiol **161**(2): 600-616.
- Hamman, R. F. (1992). "Genetic and environmental determinants of non-insulin-dependent diabetes mellitus (NIDDM)." Diabetes Metab Rev **8**(4): 287-338.
- Hanley, A. J., S. B. Harris, et al. (2005). "Complications of Type 2 Diabetes Among Aboriginal Canadians: prevalence and associated risk factors." Diabetes Care **28**(8): 2054-2057.
- Harbilas, D., A. Brault, et al. (2012). "*Populus balsamifera* L. (Salicaceae) mitigates the development of obesity and improves insulin sensitivity in a diet-induced obese mouse model." J Ethnopharmacol **141**(3): 1012-1020.
- Harbilas, D., L. C. Martineau, et al. (2009). "Evaluation of the antidiabetic potential of selected medicinal plant extracts from the Canadian boreal forest used to treat symptoms of diabetes: part II." Can J Physiol Pharmacol **87**(6): 479-492.
- Harbilas, D., D. Vallerand, et al. (2012). "*Larix laricina*, an Antidiabetic Alternative Treatment from the Cree of Northern Quebec Pharmacopoeia, Decreases Glycemia and Improves Insulin Sensitivity In Vivo." Evid Based Complement Alternat Med **2012**: 296432.
- Harbilas, D., D. Vallerand, et al. (2013). "*Populus balsamifera* Extract and Its Active Component Salicortin Reduce Obesity and Attenuate Insulin Resistance in a Diet-Induced Obese Mouse Model." Evid Based Complement Alternat Med **2013**: 172537.
- Harris, C. S., A. J. Burt, et al. (2007). "A single HPLC-PAD-APCI/MS method for the quantitative comparison of phenolic compounds found in leaf, stem, root and fruit extracts of *Vaccinium angustifolium*." Phytochem Anal **18**(2): 161-169.
- Harris, C. S., F. Mo, et al. (2007). "Plant phenolics regulate neoplastic cell growth and survival: a quantitative structure-activity and biochemical analysis." Can J Physiol Pharmacol **85**(11): 1124-1138.

- Haslam, E. (1988). "Plant polyphenols (syn. vegetable tannins) and chemical defense-A reappraisal." *J Chem Ecol* **14**(10): 1789-1805.
- Hawley, J. A. and S. J. Lessard (2008). "Exercise training-induced improvements in insulin action." *Acta Physiol (Oxf)* **192**(1): 127-135.
- He, L., A. Sabet, et al. (2009). "Metformin and insulin suppress hepatic gluconeogenesis through phosphorylation of CREB binding protein." *Cell* **137**(4): 635-646.
- Hegele, R. A. (2001). "Genes, environment and diabetes in Canadian aboriginal communities." *Adv Exp Med Biol* **498**: 11-20.
- Herzig, S., F. Long, et al. (2001). "CREB regulates hepatic gluconeogenesis through the coactivator PGC-1." *Nature* **413**(6852): 179-183.
- Horrigan, L. A., C. A. Holohan, et al. (2012). "Blueberry juice causes potent relaxation of rat aortic rings via the activation of potassium channels and the H(2)S pathway." *Food Funct.*  
<http://www.diabetes.ca/diabetes-and-you/what/prevalence/>.
- Huang, C. and J. C. Florez (2011). "Pharmacogenetics in type 2 diabetes: potential implications for clinical practice." *Genome Med* **3**(11): 76.
- Hutton, J. C. and R. M. O'Brien (2009). "Glucose-6-phosphatase catalytic subunit gene family." *J Biol Chem* **284**(43): 29241-29245.
- Hwang, J. T., D. Y. Kwon, et al. (2009). "AMP-activated protein kinase: a potential target for the diseases prevention by natural occurring polyphenols." *N Biotechnol* **26**(1-2): 17-22.
- Hwang, K. H., J. Y. Ahn, et al. (2011). "Abietic acid has an anti-obesity effect in mice fed a high-fat diet." *J Med Food* **14**(9): 1052-1056.
- Hwang, S. J., Y. W. Kim, et al. (2014). "Anti-inflammatory effects of chlorogenic acid in lipopolysaccharide-stimulated RAW 264.7 cells." *Inflamm Res* **63**(1): 81-90.
- IDF (2013). IDF Diabetes Atlas sixth edition. T. N. Leonor Guariguata, Jessica Beagley, Ute Linnenkamp, Olivier Jacqmain.
- Itani, S. I., N. B. Ruderman, et al. (2002). "Lipid-induced insulin resistance in human muscle is associated with changes in diacylglycerol, protein kinase C, and IkappaB-alpha." *Diabetes* **51**(7): 2005-2011.
- James, D. E., M. Strube, et al. (1989). "Molecular cloning and characterization of an insulin-regulatable glucose transporter." *Nature* **338**(6210): 83-87.
- Jewell, J. L., E. Oh, et al. (2010). "Exocytosis mechanisms underlying insulin release and glucose uptake: conserved roles for Munc18c and syntaxin 4." *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **298**(3): R517-531.
- Kade, I. J., Y. Ogunbolude, et al. (2013). "Influence of gallic acid on oxidative stress-linked streptozotocin-induced pancreatic dysfunction in diabetic rats." *J Basic Clin Physiol Pharmacol*: 1-11.
- Kadowaki, T. and T. Yamauchi (2005). "Adiponectin and adiponectin receptors." *Endocr Rev* **26**(3): 439-451.
- Kang, M. S., S. Hirai, et al. (2009). "Dehydroabietic acid, a diterpene, improves diabetes and hyperlipidemia in obese diabetic KK-Ay mice." *Biofactors* **35**(5): 442-448.
- Kang, M. S., S. Hirai, et al. (2008). "Dehydroabietic acid, a phytochemical, acts as ligand for PPARs in macrophages and adipocytes to regulate inflammation." *Biochem Biophys Res Commun* **369**(2): 333-338.

- Kang, Z., H. Zhu, et al. (2013). "Protocatechuic acid induces angiogenesis through PI3K-Akt-eNOS-VEGF signalling pathway." Basic Clin Pharmacol Toxicol **113**(4): 221-227.
- Kapur, S., B. Marcotte, et al. (1999). "Mechanism of adipose tissue iNOS induction in endotoxemia." Am J Physiol **276**(4 Pt 1): E635-641.
- Kim, M. S. and K. U. Lee (2005). "Role of hypothalamic 5'-AMP-activated protein kinase in the regulation of food intake and energy homeostasis." J Mol Med (Berl) **83**(7): 514-520.
- Klein, S., N. F. Sheard, et al. (2004). "Weight management through lifestyle modification for the prevention and management of type 2 diabetes: rationale and strategies: a statement of the American Diabetes Association, the North American Association for the Study of Obesity, and the American Society for Clinical Nutrition." Diabetes Care **27**(8): 2067-2073.
- Koerner, A., J. Kratzsch, et al. (2005). "Adipocytokines: leptin--the classical, resistin--the controversial, adiponectin--the promising, and more to come." Best Pract Res Clin Endocrinol Metab **19**(4): 525-546.
- Krentz, A. J. and C. J. Bailey (2005). "Oral antidiabetic agents: current role in type 2 diabetes mellitus." Drugs **65**(3): 385-411.
- Krentz, A. J., C. J. Bailey, et al. (2000). "Thiazolidinediones for type 2 diabetes. New agents reduce insulin resistance but need long term clinical trials." BMJ **321**(7256): 252-253.
- Krentz, A. J., R. E. Ferner, et al. (1994). "Comparative tolerability profiles of oral antidiabetic agents." Drug Saf **11**(4): 223-241.
- Krikorian, R., M. D. Shidler, et al. (2010). "Blueberry supplementation improves memory in older adults." J Agric Food Chem **58**(7): 3996-4000.
- Lazar, D. F., R. J. Wiese, et al. (1995). "Mitogen-activated protein kinase kinase inhibition does not block the stimulation of glucose utilization by insulin." J Biol Chem **270**(35): 20801-20807.
- Leduc, C., J. Coonishish, et al. (2006). "Plants used by the Cree Nation of Eeyou Istchee (Quebec, Canada) for the treatment of diabetes: A novel approach in quantitative ethnobotany." J Ethnopharmacol **105**(1-2): 55-63.
- Lee, M. J., Y. Wu, et al. (2010). "Adipose tissue remodeling in pathophysiology of obesity." Curr Opin Clin Nutr Metab Care **13**(4): 371-376.
- Lemieux, K., D. Konrad, et al. (2003). "The AMP-activated protein kinase activator AICAR does not induce GLUT4 translocation to transverse tubules but stimulates glucose uptake and p38 mitogen-activated protein kinases alpha and beta in skeletal muscle." FASEB J **17**(12): 1658-1665.
- Li, Y., D. Shen, et al. (2014). "Chlorogenic acid prevents isoproterenol-induced hypertrophy in neonatal rat myocytes." Toxicol Lett.
- Lietzke, S. E., S. Bose, et al. (2000). "Structural basis of 3-phosphoinositide recognition by pleckstrin homology domains." Mol Cell **6**(2): 385-394.
- Lindsay, R. S., T. Funahashi, et al. (2002). "Adiponectin and development of type 2 diabetes in the Pima Indian population." Lancet **360**(9326): 57-58.
- Liu, C. L., J. M. Wang, et al. (2002). "In vivo protective effect of protocatechuic acid on tert-butyl hydroperoxide-induced rat hepatotoxicity." Food Chem Toxicol **40**(5): 635-641.
- Manach, C., A. Scalbert, et al. (2004). "Polyphenols: food sources and bioavailability." Am J Clin Nutr **79**(5): 727-747.

- Marette, A. (2003). "Molecular mechanisms of inflammation in obesity-linked insulin resistance." Int J Obes Relat Metab Disord **27 Suppl 3**: S46-48.
- Martin, L. J., Matar, C. (2005). "Increase of antioxidant capacity of the lowbush blueberry (*Vaccinium angustifolium*) during fermentation by a novel bacterium from the fruit microflora." Journal of the Science of Food and Agriculture **85**.
- Martineau, L. C., D. C. Adeyiwola-Spoor, et al. (2010). "Enhancement of muscle cell glucose uptake by medicinal plant species of Canada's native populations is mediated by a common, metformin-like mechanism." J Ethnopharmacol **127**(2): 396-406.
- Martineau, L. C., A. Couture, et al. (2006). "Anti-diabetic properties of the Canadian lowbush blueberry *Vaccinium angustifolium* Ait." Phytomedicine **13**(9-10): 612-623.
- Martineau, L. C., J. Herve, et al. (2010). "Anti-adipogenic activities of *Alnus incana* and *Populus balsamifera* bark extracts, part I: sites and mechanisms of action." Planta Med **76**(13): 1439-1446.
- Martineau, L. C., A. Muhammad, et al. (2010). "Anti-adipogenic activities of *Alnus incana* and *Populus balsamifera* bark extracts, part II: bioassay-guided identification of actives salicortin and oregonin." Planta Med **76**(14): 1519-1524.
- Martinez, A., A. Castro, et al. (2002). "Glycogen synthase kinase 3 (GSK-3) inhibitors as new promising drugs for diabetes, neurodegeneration, cancer, and inflammation." Med Res Rev **22**(4): 373-384.
- Matchett, M. D., S. L. MacKinnon, et al. (2006). "Inhibition of matrix metalloproteinase activity in DU145 human prostate cancer cells by flavonoids from lowbush blueberry (*Vaccinium angustifolium*): possible roles for protein kinase C and mitogen-activated protein-kinase-mediated events." J Nutr Biochem **17**(2): 117-125.
- McFarland, B., D. Bigelow, et al. (2002). "Complementary and alternative medicine use in Canada and the United States." Am J Public Health **92**(10): 1616-1618.
- Mucalo, I., D. Rahelic, et al. (2012). "Effect of American ginseng (*Panax quinquefolius* L.) on glycemic control in type 2 diabetes." Coll Antropol **36**(4): 1435-1440.
- Mues, C., J. Zhou, et al. (2009). "Regulation of glucose-6-phosphatase gene expression by insulin and metformin." Horm Metab Res **41**(10): 730-735.
- Myers, M. G., Jr., J. M. Backer, et al. (1992). "IRS-1 activates phosphatidylinositol 3'-kinase by associating with src homology 2 domains of p85." Proc Natl Acad Sci U S A **89**(21): 10350-10354.
- Nachar, A., D. Vallerand, et al. (2013). "The action of antidiabetic plants of the Canadian James Bay Cree traditional pharmacopeia on key enzymes of hepatic glucose homeostasis." Evid Based Complement Alternat Med **2013**: 189819.
- Nahas, R. and M. Moher (2009). "Complementary and alternative medicine for the treatment of type 2 diabetes." Can Fam Physician **55**(6): 591-596.
- Nakae, J., B. C. Park, et al. (1999). "Insulin stimulates phosphorylation of the forkhead transcription factor FKHR on serine 253 through a Wortmannin-sensitive pathway." J Biol Chem **274**(23): 15982-15985.
- Newmark, H. L. (1997). "Squalene, olive oil, and cancer risk: a review and hypothesis." Cancer Epidemiol Biomarkers Prev **6**(12): 1101-1103.
- Nicoue, E. E., S. Savard, et al. (2007). "Anthocyanins in wild blueberries of Quebec: extraction and identification." J Agric Food Chem **55**(14): 5626-5635.

- Nissen, S. E. and K. Wolski (2007). "Effect of rosiglitazone on the risk of myocardial infarction and death from cardiovascular causes." *N Engl J Med* **356**(24): 2457-2471.
- Nistor Baldea, L. A., L. C. Martineau, et al. (2010). "Inhibition of intestinal glucose absorption by anti-diabetic medicinal plants derived from the James Bay Cree traditional pharmacopeia." *J Ethnopharmacol* **132**(2): 473-482.
- Nordlie, R. C., J. D. Foster, et al. (1999). "Regulation of glucose production by the liver." *Annu Rev Nutr* **19**: 379-406.
- Olson, A. L. and J. E. Pessin (1996). "Structure, function, and regulation of the mammalian facilitative glucose transporter gene family." *Annu Rev Nutr* **16**: 235-256.
- Ouchi, N., S. Kihara, et al. (2000). "Adiponectin, an adipocyte-derived plasma protein, inhibits endothelial NF-kappaB signaling through a cAMP-dependent pathway." *Circulation* **102**(11): 1296-1301.
- Pantsulaia, I., G. Livshits, et al. (2007). "Genetic and environmental determinants of circulating resistin level in a community-based sample." *Eur J Endocrinol* **156**(1): 129-135.
- Patti, M. E. and C. R. Kahn (1998). "The insulin receptor--a critical link in glucose homeostasis and insulin action." *J Basic Clin Physiol Pharmacol* **9**(2-4): 89-109.
- Perreault, M. and A. Marette (2001). "Targeted disruption of inducible nitric oxide synthase protects against obesity-linked insulin resistance in muscle." *Nat Med* **7**(10): 1138-1143.
- Pessin, J. E. and A. R. Saltiel (2000). "Signaling pathways in insulin action: molecular targets of insulin resistance." *J Clin Invest* **106**(2): 165-169.
- Pessin, J. E., D. C. Thurmond, et al. (1999). "Molecular basis of insulin-stimulated GLUT4 vesicle trafficking. Location! Location! Location!" *J Biol Chem* **274**(5): 2593-2596.
- Petersen, K. F., G. W. Cline, et al. (2001). "Contribution of net hepatic glycogen synthesis to disposal of an oral glucose load in humans." *Metabolism* **50**(5): 598-601.
- Pietta, P. G. (2000). "Flavonoids as antioxidants." *J Nat Prod* **63**(7): 1035-1042.
- Pilkis, S. J. and D. K. Granner (1992). "Molecular physiology of the regulation of hepatic gluconeogenesis and glycolysis." *Annu Rev Physiol* **54**: 885-909.
- Pilon, G., A. Charbonneau, et al. (2010). "Endotoxin mediated-iNOS induction causes insulin resistance via ONOO(-) induced tyrosine nitration of IRS-1 in skeletal muscle." *PLoS One* **5**(12): e15912.
- Pirola, L., A. M. Johnston, et al. (2004). "Modulation of insulin action." *Diabetologia* **47**(2): 170-184.
- Postic, C., R. Dentin, et al. (2004). "Role of the liver in the control of carbohydrate and lipid homeostasis." *Diabetes Metab* **30**(5): 398-408.
- Pratley, R. E. (2008). "Overview of glucagon-like peptide-1 analogs and dipeptidyl peptidase-4 inhibitors for type 2 diabetes." *Medscape J Med* **10**(7): 171.
- Prior, R. L., S. A. Lazarus, et al. (2001). "Identification of procyanidins and anthocyanins in blueberries and cranberries (*Vaccinium* spp.) using high-performance liquid chromatography/mass spectrometry." *J Agric Food Chem* **49**(3): 1270-1276.
- Puigserver, P., J. Rhee, et al. (2003). "Insulin-regulated hepatic gluconeogenesis through FOXO1-PGC-1alpha interaction." *Nature* **423**(6939): 550-555.

- Ramkumar, K., R. Vijayakumar, et al. (2013). "Protective effect of gallic acid on alloxan-induced oxidative stress and osmotic fragility in rats." Hum Exp Toxicol **33**(6): 638-649.
- Rao, P. N., A. Shashidhar, et al. (2013). "In utero fuel homeostasis: Lessons for a clinician." Indian J Endocrinol Metab **17**(1): 60-68.
- Reaven, G. M. (1988). "Banting lecture 1988. Role of insulin resistance in human disease." Diabetes **37**(12): 1595-1607.
- Reaven, G. M. (2002). "Multiple CHD risk factors in type 2 diabetes: beyond hyperglycaemia." Diabetes Obes Metab **4 Suppl 1**: S13-18.
- Reddy, L. H. and P. Couvreur (2009). "Squalene: A natural triterpene for use in disease management and therapy." Adv Drug Deliv Rev **61**(15): 1412-1426.
- Reshef, L., Y. Olswang, et al. (2003). "Glyceroneogenesis and the triglyceride/fatty acid cycle." J Biol Chem **278**(33): 30413-30416.
- Ribon, V., R. Herrera, et al. (1998). "A role for CAP, a novel, multifunctional Src homology 3 domain-containing protein in formation of actin stress fibers and focal adhesions." J Biol Chem **273**(7): 4073-4080.
- Ribon, V., J. H. Johnson, et al. (1998). "Thiazolidinediones and insulin resistance: peroxisome proliferator-activated receptor gamma activation stimulates expression of the CAP gene." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(25): 14751-14756.
- Ribon, V. and A. R. Saltiel (1997). "Insulin stimulates tyrosine phosphorylation of the proto-oncogene product of c-Cbl in 3T3-L1 adipocytes." Biochem J **324 ( Pt 3)**: 839-845.
- Rimando, A. M., W. Kalt, et al. (2004). "Resveratrol, pterostilbene, and piceatannol in vaccinium berries." J Agric Food Chem **52**(15): 4713-4719.
- Roach, P. J. (2002). "Glycogen and its metabolism." Curr Mol Med **2**(2): 101-120.
- Rosella, G., J. D. Zajac, et al. (1993). "Impaired suppression of gluconeogenesis induced by overexpression of a noninsulin-responsive phosphoenolpyruvate carboxykinase gene." Mol Endocrinol **7**(11): 1456-1462.
- Rosen, E. D. and B. M. Spiegelman (2001). "PPARgamma : a nuclear regulator of metabolism, differentiation, and cell growth." J Biol Chem **276**(41): 37731-37734.
- Rosenwasser, R. F., S. Sultan, et al. (2013). "SGLT-2 inhibitors and their potential in the treatment of diabetes." Diabetes Metab Syndr Obes **6**: 453-467.
- Saint-Leger, D., A. Bague, et al. (1986). "A possible role for squalene in the pathogenesis of acne. I. In vitro study of squalene oxidation." Br J Dermatol **114**(5): 535-542.
- Saleem, A., C. S. Harris, et al. (2010). "A RP-HPLC-DAD-APCI/MSD method for the characterisation of medicinal Ericaceae used by the Eeyou Istchee Cree First Nations." Phytochem Anal **21**(4): 328-339.
- Saltiel, A. R. (1996). "Diverse signaling pathways in the cellular actions of insulin." Am J Physiol **270**(3 Pt 1): E375-385.
- Saltiel, A. R. and C. R. Kahn (2001). "Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism." Nature **414**(6865): 799-806.
- Samuel, V. T. and G. I. Shulman (2012). "Mechanisms for insulin resistance: common threads and missing links." Cell **148**(5): 852-871.
- Schmoll, D., K. S. Walker, et al. (2000). "Regulation of glucose-6-phosphatase gene expression by protein kinase Balpha and the forkhead transcription factor FKHR.

- Evidence for insulin response unit-dependent and -independent effects of insulin on promoter activity." J Biol Chem **275**(46): 36324-36333.
- Seeram, N. P. (2008). "Berry fruits: compositional elements, biochemical activities, and the impact of their intake on human health, performance, and disease." J Agric Food Chem **56**(3): 627-629.
- Shen, W., R. Qi, et al. (2012). "Chlorogenic acid inhibits LPS-induced microglial activation and improves survival of dopaminergic neurons." Brain Res Bull **88**(5): 487-494.
- Shepherd, P. R. and B. B. Kahn (1999). "Glucose transporters and insulin action--implications for insulin resistance and diabetes mellitus." N Engl J Med **341**(4): 248-257.
- Shimomura, I., Y. Bashmakov, et al. (1999). "Insulin selectively increases SREBP-1c mRNA in the livers of rats with streptozotocin-induced diabetes." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(24): 13656-13661.
- Shulman, G. I. (2000). "Cellular mechanisms of insulin resistance." J Clin Invest **106**(2): 171-176.
- Silfen, M. E., A. M. Manibo, et al. (2001). "Comparison of simple measures of insulin sensitivity in young girls with premature adrenarche: the fasting glucose to insulin ratio may be a simple and useful measure." J Clin Endocrinol Metab **86**(6): 2863-2868.
- Spoor, D. C., L. C. Martineau, et al. (2006). "Selected plant species from the Cree pharmacopoeia of northern Quebec possess anti-diabetic potential." Can J Physiol Pharmacol **84**(8-9): 847-858.
- Steppan, C. M., S. T. Bailey, et al. (2001). "The hormone resistin links obesity to diabetes." Nature **409**(6818): 307-312.
- Stern, M. P. (2000). "Strategies and prospects for finding insulin resistance genes." J Clin Invest **106**(3): 323-327.
- Stienstra, R., C. Duval, et al. (2007). "PPARs, Obesity, and Inflammation." PPAR Res **2007**: 95974.
- Su, H. C., L. M. Hung, et al. (2006). "Resveratrol, a red wine antioxidant, possesses an insulin-like effect in streptozotocin-induced diabetic rats." Am J Physiol Endocrinol Metab **290**(6): E1339-1346.
- Takahashi, N., T. Kawada, et al. (2003). "Abietic acid activates peroxisome proliferator-activated receptor-gamma (PPARgamma) in RAW264.7 macrophages and 3T3-L1 adipocytes to regulate gene expression involved in inflammation and lipid metabolism." FEBS Lett **550**(1-3): 190-194.
- Takahashi, N., R. Yao, et al. (2011). "Dehydroabietic acid activates peroxisome proliferator-activated receptor-gamma and stimulates insulin-dependent glucose uptake into 3T3-L1 adipocytes." Biofactors **37**(4): 309-314.
- Thomas, J. A., K. K. Schlender, et al. (1968). "A rapid filter paper assay for UDPglucose-glycogen glucosyltransferase, including an improved biosynthesis of UDP-14C-glucose." Anal Biochem **25**(1): 486-499.
- Thorens, B. and M. Mueckler (2010). "Glucose transporters in the 21st Century." Am J Physiol Endocrinol Metab **298**(2): E141-145.
- Thouez, J. P., J. M. Ekoe, et al. (1990). "Obesity, hypertension, hyperuricemia and diabetes mellitus among the Cree and Inuit of northern Quebec." Arctic Med Res **49**(4): 180-188.

- Tilg, H. and A. R. Moschen (2006). "Adipocytokines: mediators linking adipose tissue, inflammation and immunity." Nat Rev Immunol **6**(10): 772-783.
- Towler, M. C. and D. G. Hardie (2007). "AMP-activated protein kinase in metabolic control and insulin signaling." Circ Res **100**(3): 328-341.
- Trayhurn, P. and I. S. Wood (2004). "Adipokines: inflammation and the pleiotropic role of white adipose tissue." Br J Nutr **92**(3): 347-355.
- Tremblay, F., J. Waterhouse, et al. (2012). "Prophylactic neuroprotection by blueberry-enriched diet in a rat model of light-induced retinopathy." J Nutr Biochem.
- Tschop, M. and G. Thomas (2006). "Fat fuels insulin resistance through Toll-like receptors." Nat Med **12**(12): 1359-1361.
- Ulusu, N. N., D. Ercil, et al. (2002). "Abietic acid inhibits lipoxygenase activity." Phytother Res **16**(1): 88-90.
- Umadevi, S., V. Gopi, et al. (2013). "Inhibitory effect of gallic acid on advanced glycation end products induced up-regulation of inflammatory cytokines and matrix proteins in H9C2 (2-1) cells." Cardiovasc Toxicol **13**(4): 396-405.
- Van Wagner, L. B. and M. E. Rinella (2011). "The role of insulin-sensitizing agents in the treatment of nonalcoholic steatohepatitis." Therap Adv Gastroenterol **4**(4): 249-263.
- Van Wauwe, J. and B. Haefner (2003). "Glycogen synthase kinase-3 as drug target: from wallflower to center of attention." Drug News Perspect **16**(9): 557-565.
- Verspohl, E. J. (2009). "Novel therapeutics for type 2 diabetes: incretin hormone mimetics (glucagon-like peptide-1 receptor agonists) and dipeptidyl peptidase-4 inhibitors." Pharmacol Ther **124**(1): 113-138.
- Viollet, B., F. Andreelli, et al. (2003). "Physiological role of AMP-activated protein kinase (AMPK): insights from knockout mouse models." Biochem Soc Trans **31**(Pt 1): 216-219.
- Viollet, B., R. Mounier, et al. (2007). "Targeting AMP-activated protein kinase as a novel therapeutic approach for the treatment of metabolic disorders." Diabetes Metab **33**(6): 395-402.
- Vuksan, V., M. K. Sung, et al. (2008). "Korean red ginseng (*Panax ginseng*) improves glucose and insulin regulation in well-controlled, type 2 diabetes: results of a randomized, double-blind, placebo-controlled study of efficacy and safety." Nutr Metab Cardiovasc Dis **18**(1): 46-56.
- Vuong, T., A. Benhaddou-Andaloussi, et al. (2009). "Antiobesity and antidiabetic effects of biotransformed blueberry juice in KKA(y) mice." Int J Obes (Lond) **33**(10): 1166-1173.
- Vuong, T., L. C. Martineau, et al. (2007). "Fermented Canadian lowbush blueberry juice stimulates glucose uptake and AMP-activated protein kinase in insulin-sensitive cultured muscle cells and adipocytes." Can J Physiol Pharmacol **85**(9): 956-965.
- Vuong, T., C. Matar, et al. (2010). "Biotransformed blueberry juice protects neurons from hydrogen peroxide-induced oxidative stress and mitogen-activated protein kinase pathway alterations." Br J Nutr **104**(5): 656-663.
- Wang, Y. and P. J. Roach (1993). "Inactivation of rabbit muscle glycogen synthase by glycogen synthase kinase-3. Dominant role of the phosphorylation of Ser-640 (site-3a)." J Biol Chem **268**(32): 23876-23880.



- Ward, C. W. (1999). "Members of the insulin receptor family contain three fibronectin type III domains." *Growth Factors* **16**(4): 315-322.
- Watford, M. (2005). "Is the small intestine a gluconeogenic organ." *Nutr Rev* **63**(10): 356-360.
- Watson, R. T., S. Shigematsu, et al. (2001). "Lipid raft microdomain compartmentalization of TC10 is required for insulin signaling and GLUT4 translocation." *J Cell Biol* **154**(4): 829-840.
- Wei, M., X. Chu, et al. (2013). "Protocatechuic acid suppresses ovalbumin-induced airway inflammation in a mouse allergic asthma model." *Int Immunopharmacol* **15**(4): 780-788.
- Weyer, C., R. L. Hanson, et al. (2000). "A high fasting plasma insulin concentration predicts type 2 diabetes independent of insulin resistance: evidence for a pathogenic role of relative hyperinsulinemia." *Diabetes* **49**(12): 2094-2101.
- WHO (1999). Definition, Diagnostic and classification of Diabetes mellitus and its complications. Part 1: Diagnostic and classification of Diabetes mellitus, Departement of Noncommunicable Disease Surveillance. Geneva.
- WHO (2011). Global status report on noncommunicable diseases 2010. Geneva.
- Winder, W. W. and D. G. Hardie (1999). "AMP-activated protein kinase, a metabolic master switch: possible roles in type 2 diabetes." *Am J Physiol* **277**(1 Pt 1): E1-10.
- Wong, K. A. and H. F. Lodish (2006). "A revised model for AMP-activated protein kinase structure: The alpha-subunit binds to both the beta- and gamma-subunits although there is no direct binding between the beta- and gamma-subunits." *J Biol Chem* **281**(47): 36434-36442.
- Wu, X., G. R. Beecher, et al. (2006). "Concentrations of anthocyanins in common foods in the United States and estimation of normal consumption." *J Agric Food Chem* **54**(11): 4069-4075.
- Yamauchi, T., J. Kamon, et al. (2002). "Adiponectin stimulates glucose utilization and fatty-acid oxidation by activating AMP-activated protein kinase." *Nat Med* **8**(11): 1288-1295.
- Yeh, G. Y., D. M. Eisenberg, et al. (2003). "Systematic review of herbs and dietary supplements for glycemic control in diabetes." *Diabetes Care* **26**(4): 1277-1294.
- Yki-Jarvinen, H. (2004). "Thiazolidinediones." *N Engl J Med* **351**(11): 1106-1118.
- Yoon, J. C., P. Puigserver, et al. (2001). "Control of hepatic gluconeogenesis through the transcriptional coactivator PGC-1." *Nature* **413**(6852): 131-138.
- Yu, C., Y. Chen, et al. (2002). "Mechanism by which fatty acids inhibit insulin activation of insulin receptor substrate-1 (IRS-1)-associated phosphatidylinositol 3-kinase activity in muscle." *J Biol Chem* **277**(52): 50230-50236.
- Zadernowski, R., M. Naczki, et al. (2005). "Phenolic acid profiles in some small berries." *J Agric Food Chem* **53**(6): 2118-2124.
- Zang, M., A. Zuccollo, et al. (2004). "AMP-activated protein kinase is required for the lipid-lowering effect of metformin in insulin-resistant human HepG2 cells." *J Biol Chem* **279**(46): 47898-47905.
- Zhang, W., S. Patil, et al. (2006). "FoxO1 regulates multiple metabolic pathways in the liver: effects on gluconeogenic, glycolytic, and lipogenic gene expression." *J Biol Chem* **281**(15): 10105-10117.

- Zheng, W. and S. Y. Wang (2003). "Oxygen radical absorbing capacity of phenolics in blueberries, cranberries, chokeberries, and lingonberries." J Agric Food Chem **51**(2): 502-509.
- Zhou, G., R. Myers, et al. (2001). "Role of AMP-activated protein kinase in mechanism of metformin action." J Clin Invest **108**(8): 1167-1174.
- Zimmet, P., A. Hodge, et al. (1996). "Serum leptin concentration, obesity, and insulin resistance in Western Samoans: cross sectional study." BMJ **313**(7063): 965-969.